

15This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



<b>(51) 国際特許分類7</b> A61K 45/00, 31/155, 31/095, 31/44, 31/74, 33/00, 33/08, 33/44, 38/06, 31/198, A61M 1/16, 1/36, A61P 7/08	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/69466</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年11月23日(23.11.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP00/03029  <b>(22) 国際出願日</b> 2000年5月11日(11.05.00)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/131978      1999年5月12日(12.05.99)      JP  <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/JP] 〒259-1117 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101 Kanagawa, (JP) <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP) <b>(74) 代理人</b> 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)	<b>(81) 指定国</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: TRAPPING AGENT FOR BLOOD CARBONYL COMPOUNDS</b>  <b>(54)発明の名称</b> 血中カルボニル化合物トラップ剤  <b>(57) Abstract</b> The carbonyl compounds contained in patient blood can be effectively removed by bringing the blood into contact with a trapping agent for carbonyl compounds, whereby the disorders due to the compounds (e.g., carbonyl stress) can be relieved.		

(57)要約

カルボニル化合物トラップ剤を患者血液に接触させる。これにより、患者の血中に含まれるカルボニル化合物が効果的に除去され、カルボニル化合物による障害（カルボニルストレス）を軽減できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

### 血中カルボニル化合物トラップ剤

#### 技術分野

本発明は、血中のカルボニル化合物の除去に関する。具体的には、カルボニル化合物トラップ剤を用いる、血中のカルボニル化合物の除去に関する。

#### 背景技術

血液透析は慢性腎不全患者に対して一般的に行われる治療であり、半透膜を介して血液と透析液が接触することにより、血中の老廃物や毒性物質が除去される。しかし、腎不全の病態は、透析により完全に食い止められるものではない。そのような病態として、腎不全患者における AGE (advanced glycation end products) やその前駆体であるカルボニル中間体のレベルの上昇が挙げられる。AGE は、タンパク質を構造的および機能的に修飾し、透析アミロイドーシスや動脈硬化などの透析合併症の発症に関与することが報告されている (Makita Z, et al. N Engl J Med 325: 836-842, 1991; Miyata T, et al. J Clin Invest 92: 1243-1252, 1993; Miyata T, et al. J Clin Invest 93: 521-528, 1994; Miyata T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2353-2358, 1996; Horie K, et al. J Clin Invest 100: 2995-3004, 1997; Miyata T, et al. FEBS letters 445: 202-206, 1999)。腎不全では血漿中にグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン、アラビノース (Odani et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 256: 89-93, 1999; Niwa et al., Nephron 69: 438-443, 1995; Miyata et al., Kidney Int. 55: 389-399, 1999; Miyata et al., J. Am. Soc. Nephrol. 9: 2349-2356, 1998) などのカルボニル中間体が蓄積すること (いわゆるカルボニルストレス) により、AGE 産物レベルが上昇することが、近年明らかにされた (Miyata



T, et al. J Am Soc Nephrol 9: 2349-2356, 1998; Miyata T, et al. Kidney Int 55: 389-399, 1999)。AGE 前駆体であるさまざまなカルボニル中間体は、主として炭水化物および脂質に由来する (Miyata T, et al. Kidney Int 55: 389-399, 1999; Miyata T, et al. Kidney Int 54: 1290-1295, 1998; Miyata T, et al. Kidney Int 51: 1170-1181, 1997)。腎不全患者における、これら AGE やカルボニル中間体のレベルの上昇、すなわち、「カルボニルストレス」は、現行の血液透析では有効に改善することはできない。

#### 発明の開示

本発明は、血中のカルボニル化合物を除去するためのカルボニル化合物トラップ剤の提供を課題とする。また、本発明は、生体のカルボニルストレス状態を改善するための方法および薬剤の提供を課題としている。本発明により、特にカルボニルストレス状態に陥りやすい血液透析患者において、カルボニル化合物による障害を防止することが可能となる。血液透析患者のカルボニル化合物による障害をできるだけ小さくすることが本発明の課題である。

本発明者は、まず、血液透析に使用される血液透析膜が、患者血中のカルボニル化合物量にどのような影響を及ぼすのかを検討した。カルボニル中間体の蓄積 (カルボニルストレス) を表すマーカーであるペントシジンの血中含量を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量し、患者が透析に使用している透析膜の種類別に比較した。その結果、遊離ペントシジンは、いずれの透析膜を使用した場合でも透析により顕著に除去されるものの、体内のペントシジンの大半を占める蛋白結合型ペントシジンは、透析によっては効果的に除去できていないことが判明した。

透析膜の種類別では、low-flux セルロース、high-flux ポリメチルメタクリレート (PMMA)、および AN69 においては、蛋白結合型および遊離型ペントシジンは、両者とも同様の値を示したが、high-flux ポリスルフォン (PS) においては低い

値を示した ( $p < 0.01$ )。患者が日本人であるかベルギー人であるか、または PS 膜のメーカーなどで差は認められなかった。患者が使用する透析膜を AN69 から PS に変更した 3 人の患者では、蛋白結合型ペントシジンのレベルが低下し、再び AN69 に戻すと、もとのレベルまで上昇した。これらの結果から、カルボニル化合物の生成を抑制するための透析膜としては、ポリスルホン膜が有効であることが判明した。

本発明者は次に、血中のカルボニル化合物をより効果的に除去するため、カルボニル化合物トラップ剤を利用することを考えた。透析患者血液から血漿を調製し、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と共にインキュベートし、血中カルボニル化合物量の定量を行った。その結果、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体とのインキュベーションにより、血中カルボニル化合物量は有意に低下することが判明した。

このようなことから、本発明者は、血中に蓄積するカルボニル化合物をより重視し、タンパク質修飾を中心とした透析患者のカルボニルストレスを改善するためには、血中に蓄積するカルボニル化合物の除去が必要と考えた。そこでこの課題の解決のために、カルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させる機能を有する化合物の利用が有効であることを見出し本発明を完成した。本発明において、このような機能を有する化合物を固定化した担体、あるいはこのような化合物そのものを「カルボニル化合物トラップ剤」と呼ぶ。

すなわち本発明は、以下に記載の、血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤、および生体のカルボニルストレス状態を改善するための方法および薬剤に関する。

- 〔1〕 血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤。
- 〔2〕 血液透析に用いるための、〔1〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
- 〔3〕 カルボニル化合物トラップ剤が、血液に不溶性の担体に固定化されたもの

である〔１〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔４〕 担体が透析膜である、〔３〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔５〕 透析膜がポリスルホン膜である、〔４〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔６〕 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、〔１〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔７〕 メイラード反応阻害剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ＳＨ基含有化合物、およびそれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも１つの化合物である、〔６〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔８〕 カルボニル化合物トラップ剤が、血液に不溶性の化合物からなることを特徴とする〔１〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔９〕 血液に不溶性の化合物が、イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲル、アルミナ、および炭酸カルシウムからなる群から選択された少なくとも１つの化合物である、〔８〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤。

〔１０〕 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、生体のカルボニルストレス状態改善剤。

〔１１〕 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、血液におけるカルボニルストレス状態改善剤。

〔１２〕 血液回路内に固定化するための、〔１１〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

〔１３〕 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、〔１１〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

〔１４〕 メイラード反応阻害剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ＳＨ基含有化合物、およびそれらの誘導体からなる群から選択される少なくとも１つの化合物である、〔１３〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

〔15〕 患者血液を血液回路内においてカルボニル化合物トラップ剤に接触させる工程を含む、カルボニルストレス状態の改善方法。

〔16〕 カルボニル化合物トラップ剤が血液に不溶性の担体に固定化されていることを特徴とする、〔15〕に記載の方法。

あるいは本発明は、カルボニル化合物トラップ剤の、血中のカルボニル化合物の除去における使用に関する。更に本発明は、カルボニル化合物トラップ剤の、血中のカルボニルストレス状態改善剤の製造のための使用に関する。

本発明において、トラップの対象となるカルボニル化合物とは、例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスにともなって蓄積する以下のような化合物が含まれる。

炭水化物に由来するカルボニル化合物：

- ・アラビノース
- ・グリオキサール
- ・メチルグリオキサール
- ・3-デオキシグルコゾン

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

- ・デヒドロアスコルビン酸

脂質に由来するカルボニル化合物：

- ・ヒドロキシノネナール
- ・マロンジアルデヒド
- ・アクロレイン

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、これら全てのカルボニル化合物に対し、化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させるものであることが望ましいが、これらのカルボニル化合物の中で主要なもののみに対して有効な場合も含まれる。本発明において使用することができるカルボニル化合物トラップ剤には、例えば以下のようなものが含まれる。

・ アミノグアニジン(Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))

・  $\pm 2$ -イソプロピリデネヒドラゾノ-4-オクソ-チアゾリジン-5-イルアセタニリド( $\pm 2$ -isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide: OPB-9195) (S. Nakamura, 1997, Diabetes. 46:895-899)

さらにカルボニル化合物トラップ剤としては、例えば以下のような化合物またはそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を用いることができる。なお、誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。これらの化合物は血液との分離を容易にするために担体に結合させて本発明によるカルボニル化合物トラップ剤とすることができる。あるいは、化合物自体が血液に対して不溶性であれば、担体に固定することなく本発明のカルボニル化合物トラップ剤として用いることができる。

(1) メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体(特開昭62-142114号、特開昭62-249908号、特開平1-56614号、特開平1-83059号、特開平2-156号、特開平2-765号、特開平2-42053号、特開平6-9380号、特表平5-505189号)。

(2) スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3) ピラゾロン(特開平6-287179号)、ピラゾリン(特開平10-167965号)、ピラゾール(特開平6-192089号、特開平6-298737号、特開平6-298738号)、イミダゾリジン(特開平5-201993号、特開平6-135968号、特開平7-133264号、特開平10-182460号)、ヒダントイン(特開平6-135968号)などの2個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(4) トリアゾール(特開平6-192089号)などの3個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(5) チアゾリン(特開平10-167965号)、チアゾール(特開平4-93

75号、特開平9-59258号)、チアゾリジン(特開平5-201993号、特開平3-261772号、特開平7-133264号、特開平8-157473号)などの1個の窒素原子と1個の硫黄原子を有する5員複素環式化合物。

(6)オキサゾール(特開平9-59258号)などの1個の窒素原子と1個の酸素原子を有する5員複素環式化合物。

(7)ピリジン(特開平10-158244号、特開平10-175954号)、ピリミジン(特表平7-500811号)などの含窒素6員複素環式化合物。

(8)インダゾール(特開平6-287180号)、ベンゾイミダゾール(特開平6-305964号)、キノリン(特開平3-161441号)などの含窒素縮合複素環式化合物。

(9)ベンゾチアゾール(特開平6-305964号)などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。

(10)ベンゾチオフェン(特開平7-196498号)などの含硫縮合複素環式化合物。

(11)ベンゾピラン(特開平3-204874号、特開平4-308586号)などの含酸素縮合複素環式化合物。

(12)カルバゾイル(特開平2-156号、特開平2-753号)、カルバジン酸(特開平2-167264号)、ヒドラジン(特開平3-148220号)などの窒素化合物。

(13)ベンゾキノン(特開平9-315960号)、ヒドロキノン(特開平5-9114号)などのキノン類。

(14)脂肪族ジカルボン酸(特開平1-56614号、特開平5-310565号)。

(15)ケイ素含有化合物(特開昭62-249709号)。

(16)有機ゲルマニウム化合物(特開平2-62885号、特開平5-255130号、特開平7-247296号、特開平8-59485号)。

(17)フラボノイド類 (特開平 3-240725 号、特開平 7-206838 号、特開平 9-241165 号、WO 94/04520)。

(18)アルキルアミン類 (特開平 6-206818 号、特開平 9-59233 号、特開平 9-40626 号、特開平 9-124471 号)。

(19)アミノ酸類 (特表平 4-502611 号、特表平 7-503713 号)。

(20)アスコクロリン (特開平 6-305959 号)、安息香酸 (WO 91/11997)、ピロロナフチリジニウム (特開平 10-158265 号) などの芳香族化合物。

(21)ポリペプチド (特表平 7-500580 号)。

(22)ピリドキサミンなどのビタミン類 (WO 97/09981)。

(23)グルタチオンやシステインなどのSH基含有化合物。

(24)還元型アルブミンなどのSH基含有蛋白。

(25)テトラサイクリン系化合物 (特開平 6-256280 号)。

(26)キトサン類 (特開平 9-221427 号)。

(27)タンニン類 (特開平 9-40519 号)。

(28)第4級アンモニウムイオン含有化合物。

(29)メトホルミン、フェンホルミン、およびブホルミンなどのビグアナイド。

(30)イオン交換樹脂などの高分子化合物。

(31)活性炭、シリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウム等の無機化合物。

以上のような化合物の多くは、一般にメイラード反応阻害剤として知られている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応であり、1912年にメイラード (Maillard) がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した (Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912))。メイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン (Hb Alc) が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し (Rahbar. S., Clin. Chim. Acta, 22: 296 (1968))、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。そして、このような生体内のメイラード反応を阻害する物質の探索が精力的に行われ、前述の化合物類がメイラード反応阻害剤として見いだされた。

しかし、このようなメイラード反応阻害剤が、血中のカルボニル化合物を排除して血液透析患者等のカルボニルストレス状態を改善することができるということとは知られていなかった。

本発明におけるカルボニル化合物のトラップ剤を固定化する担体としては、血液に不溶性で、人体に対して無害なもの、血液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限されない。具体的には、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系ポリマー系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などがあげられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル



酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせ使用され得る。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にカルボニル化合物トラップ剤が固定化される。固定化されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独で固定化するほか、2種類以上を固定化してもよい。またこれらの高分子材料には、適当な改質剤を添加したり、放射線架橋や過酸化物架橋などの変性処理を施すこともできる。

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などがあげられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、血液との接触面積を制御することができる。

上記担体にカルボニル化合物トラップ剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とカルボニル化合物トラップ剤の間に導入してもよい。トラップ剤に毒性がある場合など、担体からの溶出が問題となる場合には、溶出量をできるだけ少なくするためにトラップ剤は担体に共有結合で固定化されていることが好ましい。カルボニル化合物トラップ剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシ基、チオール基、ヒドロキシ基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

カルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体としては、例えば、スルホニ

ルヒドラジン基を有するポリスチレン担体 (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES 社) などの市販のものを用いることもできる。

本発明のカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体の滅菌は、公知の滅菌法から、トラップ剤や担体などの種類により適当な滅菌法が選択される。滅菌処理には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。

カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と血液との接触は、種々の形態が考えられる。例えば、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体が充填された血液バッグに採血した患者の血液を入れ、この中で患者血液のカルボニル化合物をトラップする方法、カルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填したものに血液を循環させる方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくても、血漿を分離したのち、血漿を処理してもよい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。血液バッグ内にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を含めておくことにより、血液バッグ内に保存中の血液で生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップすることも可能である。

本発明のカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と血液との接触は、血液透析や血液濾過、血液濾過透析、血液吸着、血漿分離を含む血液浄化の過程で行うことができる。

例えば、血液透析患者に対しては、血液透析回路内にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を配置させることにより、血液透析とカルボニル化合物のトラップとを同時に行うことができる。この場合、血液透析膜を担体として利用し、カルボニル化合物トラップ剤を血液透析膜に固定化しておくことが好ましい。担体として用いられる透析膜の種類は公知のものを使用することができる。例えば、再生セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース誘導体、ポリメチルメタクリレート、ポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルナイロン、シリコン、ポリエス

テル系共重合体等が挙げられ、特に限定されない。実施例に示されたように、透析膜としてポリスルフォンを用いた場合に、カルボニル中間体（ペントシジン）レベルの低下が認められた。従って、上記透析膜の中でも、特にポリスルフォン膜を担体として用いるのが好ましい。もちろん透析膜を担体とせず、上記のように、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を充填したカラムを血液透析回路中に配置させてもよい。このように患者血液をカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体に接触させることにより、血中由来のカルボニル化合物が捕捉され、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。体外循環時に血液の凝固を防ぐため、抗凝固剤を併用することもできる。抗凝固剤としては、例えば、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン（メシル酸ナファモスタット）等が挙げられる。これらは、担体に固定化されていてもよい。

血液との接触時に用いるトラップ剤が少ないと、透析時に患者血中のカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者血中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のトラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。トラップ剤の用量は、担体へのトラップ剤の固定化量、またはトラップ剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。

本発明のカルボニル化合物トラップ剤には、上述のメイラード反応阻害剤に代表される有機化合物の他、イオン交換樹脂などの高分子化合物、あるいは活性炭やシリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物も使用できる。これらの化合物は、クロマトグラフィーの充填剤として知られているものであるが、その吸着能を利用してカルボニル化合物をトラップすることができる。このような化合物は、それ自体が担体として機能するため、例えば、外部血液循環回路に装置された濾過器内に充填して使用することができる。このような化合物も、本発明によるカルボニルストレス状態改善剤を構成する「カルボニル化合物トラップ剤」として利用することができる。この場合、これらの化合物そのものが、前

記カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体として機能する。あるいは、このような自らカルボニル化合物トラップ能を有する担体に、更に他のカルボニル化合物トラップ剤を固定化することもできる。

なお、活性炭を使用した吸着型血液浄化器が公知である。吸着型血液浄化器は、薬物中毒や肝性昏睡時の血液浄化、多臓器不全としての急性腎不全発症の初期に増加する内因性・外因性の各種トキシンや血管作動性物質の除去を目的とした血液透析の補助療法として使用されている。しかしながら、かかる吸着型血液浄化器が、カルボニル化合物トラップ剤として有効であるということは全く知られていなかった。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、3 人の患者における、血漿ペントシジンレベル (pmol/mg protein) に及ぼす血液透析膜の種類の変更の効果を示す図である。結果は初期値(患者 1 (◇)、患者 2 (□)、患者 3 (△)で、それぞれ 41.8、22.1、28.5 pmol/mg protein) に対する % で表した。各値は各期間の最後に 2 週間の間隔をあけて採取された 2 サンプルの平均である (AN69 で透析していた -2 および 0 週目、PS に変更後の 8 および 10 週目、AN69 に戻した後の 14 および 16 週目)。

図 2 は、カルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズとのインキュベーションによる、透析患者血漿中のペントシジンレベルの抑制効果を示す図である。

図 3 は、活性炭によるジカルボニル化合物溶液中のカルボニル化合物のトラップ作用を示す図である。

図 4 は、活性炭による腹膜透析液中のジカルボニル化合物のトラップ作用を示す図である。

図 5 は、透析患者血漿を 37℃ でインキュベートしたときの、活性炭によるペントシジンの生成抑制効果を示す図である。

図 6 は、活性炭、あるいはスルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズによ

る、腎不全患者血漿におけるカルボニル化合物の除去作用を示す図。図中、縦軸はカルボニル化合物の濃度を示す。

図 7 は、アミノグアニジンによる、腎不全患者血漿におけるカルボニル化合物の除去作用を示す図。図中、縦軸はカルボニル化合物の濃度を示す。

図 8 は、ジアミノグアニジン結合ポリアミドの作製方法を示す図である。

図 9 は、ジアミノグアニジン結合ポリアミドによるジカルボニル化合物溶液中のカルボニル化合物の除去作用を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### [実施例 1] 血漿ペントシジンに及ぼす血液透析膜の種類の影響

##### 1. 患者

ベルギー人(n=29)または日本人(n=97)で、週 3 回の血液透析を行っている患者 126 名(男性 69 名、女性 57 名)を調査した。年齢は  $61.2 \pm 13$  (標準偏差) 歳であった。2 名のみが、軽い II 型糖尿病であった。すべての患者は、少なくとも 3 ヶ月間(または、2、3 名の患者は 3 ヶ月以内であるが、血液透析の開始以来)にわたって同じ種類の血液透析膜を使用していた。ベルギー人患者 29 名中 26 名においては、透析膜を再使用したが、日本人患者においては、再使用はなかった。各患者のカルテから、残存腎機能(ml/day)、透析膜表面積、および血液透析の透析時間のデータを得た。

##### 2. 膜の種類

血液透析膜は、high-flux (UF インデックス  $> 10 \text{ ml/mmHg/h}$ ) AN69 (Hospal (France) 社製) (AN69 群)、high-flux ポリスルフォン (Fresenius (Germany) 社製) (PS 群)、high-flux ポリスルフォン (旭メディカル (Japan) 社製) (APS 群)、high-flux ポリメチルメタクリレート (polymethylmethacrylate) (Toray (Japan) 社製)

(PMMA 群)、および low-flux セルロース (旭メディカル(Japan)社製) (セルロース群) を使用した。

### 3. 血漿試料

血漿試料は、1 回目の血液透析開始に先立って 126 名の患者全員から採取し、毎週の透析後に 66 名から採取した。

すべての試料は直ちに遠心分離を行い、-20℃に凍結した血漿について下記の検査をおこなった。

### 4. 全ペントシジンおよび遊離ペントシジンの定量

全ペントシジンの定量には、試料(50  $\mu$ l)を凍結乾燥させ、100  $\mu$ l の 6N HCl に溶解させ窒素封入後 110℃で 16 時間インキュベートし、100  $\mu$ l の 5N NaOH および 200  $\mu$ l の 0.5M リン酸バッファー(pH7.4)で中和後、孔径 0.5  $\mu$ m のフィルターで濾過し、PBS で 20 倍に希釈した。遊離型ペントシジンの定量には、試料(50  $\mu$ l)に等量の 10% TCA を混合後、5000 $\times$ g 10 分で遠心した。上清を孔径 0.5  $\mu$ m のフィルターで濾過し、蒸留水で 4 倍に希釈した。

これらの試料中のペントシジンを C18 逆相カラム (Waters, Tokyo, Japan) を用いた逆相 HPLC (Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 7: 1198-1206, 1996) で分析した。蛍光検出器 (RF-10A; Shimadzu) を用い、励起波長/検出波長を 335/385nm で流出液をモニターした。合成ペントシジンを用いて標準曲線を作成した。

蛋白結合型ペントシジン (ペントシジン/蛋白) (pmol/mg protein) は、[血漿全ペントシジン (pmol/ml) - 遊離ペントシジン (pmol/ml)] / [血漿蛋白濃度 (mg/ml)] により算出した。

### 5. 患者群間の統計解析

ペントシジンレベルの定量の結果を含む各数値は平均 $\pm$ 標準偏差またはパーセンテージ (%) として表した。残存腎機能のデータは log 変換した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) (F 検定つき) により、個人データとペントシジンレベルを、異なる透析膜を用いている血液透析患者のグループ間で比較した。さらに

Bonferroni t-test を用いて透析膜のグループを比較分析した。カイ二乗検定により、残存腎機能の程度を、さまざまな群間で比較した。

5 群の患者間の cross-sectional な解析の結果を表 1 に示す。年齢に関してはグループ間に大きな違いはなかった。血漿蛋白レベルは AN69 およびセルロース群ではより高かった。透析膜面積は APS 群において大きく、また研究前の血液透析期間・1 回の透析時間も APS 群で長かった。一方、残存腎機能は PS 群で高かった。

表 1

## 異なる透析膜で透析を行った5つの患者群の結果

	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	セルロース n=29	ANOVA P 値
年齢(歳)	58±12	61±13	64±7	61±13	64±16	NS
血液透析の期間(年)	13.7±7.5 $\alpha$	5.4±6.8	7.8±6.7	9.2±6.5	5.5±4.4	<.001
血漿蛋白レベル (g/dl)	6.7±0.5**	6.3±0.7	6.8±0.6	6.2±0.3*	7.0±0.4***	<.001
血漿アルブミンレベル(g/dl)	3.9±0.3 $\diamond\diamond$	3.6±0.4 $\diamond$	3.9±0.4 $\Delta$	3.6±0.3	4.2±0.3***	<.001
血液透析の透析時間(時間)	4.5±0.23 $\beta$	3.98±0.40	4.13±0.23	4.04±0.48	4.00±0.00	<.001
血液透析膜の表面積(m <sup>2</sup> )	1.8	1.28±0.36	1.42±0.34	1.31±0.32	1.32±0.24	ND $\neq$
残存腎機能 (ml/day)						
ジオメトリック平均 (SD)	47(10)	213(250)•	34(13)	47(8)	26(8)	<.001
(レンジ)	(0-800)	(0-3050)	(0-500)	(0-400)	(0-400)	
残存腎機能 (%) S	33%	50%•	20%	28%	17%	chi2 P 値 <.0001

\*\*\*: p&lt;0.001でPS群およびPMMA群に対し有意

\*\*: p&lt;0.001でPMMA群に対し有意

\*: p&lt;0.05でAN69群に対し有意

 $\diamond$ : p<0.05でAPS群に対し有意 $\diamond\diamond$ : p<0.01でPMMA群およびセルロース群に対し有意 $\Delta$ : p<0.05でセルロース群に対し有意 $\alpha$ : p<0.01で他のすべての群に対し有意 $\beta$ : p<0.001で他のすべての群に対し有意

: p=0.05でセルロース群に対し有意

#: 透析膜の表面積は医者により固定されているので変数とは考えられない。

従って統計学的検定により比較することはできない。

S: 無尿でない患者の割合

透析前の蛋白結合型ペントシジンおよび遊離型ペントシジンの血漿レベルは、A



N69、PMMA、およびセルロース群では同じレベルであり、PS 群および APS 群では有意に低かった。PS 群と APS 群との間では有意差はなかった（表 2）。

表 2

膜の違いによる5群における透析前のペントジンレベル

	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	セルロース n=29	ANOVA P 値
ペントジン/蛋白 (pmol/mg protein)	16.2±4.8	15±6.1	25.4±8.4**	23.2±9.3**	21.7±6.3**	<.001
遊離ペントジン (pmol/ml)	32.4±11.3	41.4±22.9	76.4±28.5**	68.8±26.7**	53.7±18.2**	<.001

\*\*:p&lt;0.01でPS群およびAPS群に対し有意

透析前の血漿ペントシジンに対し影響を与えうる様々な因子を、単変量分析により分析した結果、残存腎機能が、蛋白結合型および遊離ペントシジンに対し有意に影響を与えることが判明した。具体的には、残存腎機能が高いほど、ペントシジンレベルは低かった。血漿蛋白レベルやアルブミンレベル・年齢・透析歴は、ペントシジンレベルと相関は認められなかった(表3)。ポリスルホン群(PS群およびAPS群)の場合、Fresenius社または旭メディカル社(Asahi社)のポリスルホン膜による透析を受けたベルギー人患者または日本人患者の透析前のペントシジンレベルは同様の値を示した(表4)。

表3

一変数分析によるペントシジンレベルと潜在説明継続変数との関係:r値					
	log(残存腎機能)	全蛋白	アルブミン	年齢	透析歴
ペントシジン/蛋白	-0.28	-0.08	0	0.14	0.03
遊離ペントシジン	-0.36	0.01	-0.12	0.15	0.02

\*\*: p<0.01で有意

\*\*\*: p<0.001で有意

表4

ポリスルホン群中におけるポリスルホンのメーカー  
および/または患者の国別のペントシジンレベルと残存腎機能

	Fresenius ベルギー人	Fresenius 日本人	Asahi 日本人	P値
ペントシジン/蛋白 (pmol/mg protein)	14.6±6.2	15.3±6.3	16.2±4.8	NS
遊離ペントシジン(pmol/ml)	37.3±19.6	45.4±25.9	32.4±11.3	NS
残存腎機能(ml/day)	938(23)	49(14)	47(10)	0.004

以上のように、ポリスルホン透析膜を使用する透析患者は、他の透析膜による透析患者よりもペントシジンレベルが低いことが判明した。ポリスルホン膜で透析を行った患者は、国に関わらずペントシジンレベルの低下が認められ、さらに異なるメーカーの透析膜でも同様の結果が得られた。更に、旭メディカル社製ポリスルホン透析膜による透析を受ける患者は、実質的に無尿であるにもかかわらず、ペントシジンレベルは同様に低かった。Fresenius社製ポリスルフォ

ン群では、尿量が 300ml/min を超える患者を除外してもペントシジンレベルの差異における統計学的な有意性に変化は来さなかった。

AN69 も high-flux であり、また、high-flux の AN69 と low-flux のセルロースによる透析が、透析前のペントシジンレベルに関して同様の結果を示したことから、ペントシジンレベルの差異と透析膜の除去性能は無関係であると考えられる。

蛋白補正ペントシジンレベルおよび遊離ペントシジンレベルと残存腎機能との関係を、線形回帰分析により分析した。従属変数（蛋白補正ペントシジンレベル・遊離ペントシジンレベル）に対する各説明変数の効果を、変数選択—重回帰分析（変数増加法）（Forward stepwise multiple regression analysis）により検定した。すべての分析は、BMDP 統計ソフトウェア（BMDP は New System Professional Edition: Statistical Solutions Inc., University of California Press, Berkeley, 1995 の商標）を用いて行った。P<0.05 を有意とした。

分析の結果、透析膜の種類と残存腎機能のみが、蛋白結合型および遊離ペントシジンレベルの独立決定因子であることが示された（表 5）。相互作用はどれも有意でなかったことから、ペントシジンレベルに対する残存腎機能の影響は、透析膜の種類によって影響されないと考えられる。

表 5

ペントシジンレベルの決定因子の変数選択—重回帰分析（変数増加法）  
（Forward stepwise multiple regression analysis）

	ペントシジン/蛋白		遊離ペントシジン	
	Rの増加 (increase in R)	P値	Rの増加 (increase in R)	P値
膜の種類	0.53	<0.001	0.59	<0.001
log（残存腎機能）	-0.21	<0.001	-0.36	<0.001
全蛋白	-0.17	NS	0.05	NS
アルブミン	-0.05	NS	-0.1	NS
年齢	0.12	NS	0.16	NS
血液透析の期間	-0.01	NS	-0.08	NS

#### 6. 血液透析前後のペントシジンレベルに及ぼす透析膜の効果

透析前のペントシジンレベルに対して透析膜が効果を及ぼす機構をさらに解析

するため、high-flux ポリスルフォン (Fresenius)、AN69、PMMA、または low-flux セルロース透析膜を使った 4 群の患者に対し、透析前および後のペントシジンレベルを定量した (表 6)。

表 6

一回の血液透析におけるペントシジンレベルに対する影響				
	PS n=14	AN69 n=15	PMMA n=9	セルロース n=28
ペントシジン/蛋白 (pmol/mg protein)				
前	14.6±6.2	25.4±8.4	24.3±8.5	21.8±6.4
後	13.8±6.6	23.4±5.6	22.8±8.3	22.1±5.8
遊離ペントシジン (pmol/ml)				
前	37.3±19.6	76.4±28.5	70.3±26	53.5±18.5
後	10.9±6.6	17.5±4.9	21.7±7	14.7±6.9
(減少率) (%)	(71±11)	(76±7)	(67±9)	(73±6)

上記の実験により予想された通り、蛋白結合型ペントシジンはほとんど変化せず、また、透析膜の種類とも無関係であった。唯一、遊離ペントシジンが顕著に減少したが、その比率はすべての群で似ており、76% (AN69) から 67% (PMMA) の間であった。グループ間に有意な差はなかった。従って、ポリスルフォン膜による透析患者で透析前のペントシジンレベルが低かったことを、透析膜の透析能力の差異によって説明することはできないことが判明した。

本発明者は、以前、血液透析そのものは、全ペントシジンまたは蛋白結合型ペントシジンレベルに変更を与えないことを示した (Miyata T, et al. *Kidney Int* 51: 880-887, 1997)。この知見は、ペントシジンの 95% は、透析で除去されないアルブミンと結合している (Miyata T, et al. *J Am Soc Nephrol* 7: 1198-1206, 1996) という事実に一致する。この知見は、上記の 4 つの異なる種類の透析膜による実施例で裏付けられた。これに対し、遊離ペントシジンは血液透析により減少し、すべての透析膜で似た現象が観察されたが、この結果は、遊離ペントシジンの分子量 (379 Da) を考えれば予想されることである。血液透析の前後のペントシジンレベルが、すべての透析膜で同様であったことは、受動輸送だけでなく、ペントシジンの吸収も、ポリスルフォンや他の透析膜による透析中に同様

に起こっていることを示唆している。インビトロにおいて、放射性標識された遊離ペントシジンの吸収を測定したところ、吸収はセルロース膜およびポリスルホン膜ではごく僅かであり、事実上、差は認められなかった。

従って、ポリスルホン膜によりペントシジンの除去が向上するということで、透析前のペントシジンの低レベルを説明することはできないと思われる。別の可能性としては、ポリスルホン膜による透析が、ペントシジン産生の抑制と係わっている可能性が考えられる。

既に指摘したように、ペントシジンレベルは炭水化物に由来するカルボニル中間体の濃度を反映している。ポリスルホン膜は、これらのカルボニル化合物の除去に特異的な効果を有しており、それによりペントシジン産生に効果を発揮している可能性がある。または、ポリスルホン膜は尿毒症に関連しているとされる酸化ストレスを減少させる可能性も考えられる (Miyata T, et al. *Kidney Int* 54: 1290-1295, 1998; Miyata T, et al. *Kidney Int* 51: 1170-1181, 1997; Loughrey CM, et al. *Q J Med* 87: 679-683, 1994; Ueda Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 785-790, 1998; Kumano K, et al. *Adv Perit Dial* 1992; 8: 127-130; Witko-Sarsat V, et al. *Kidney Int* 49: 1304-1313, 1996)。酸化ストレスの減少により、カルボニル化合物の産生が抑えられ、それによりペントシジンの生成が減少する可能性もある (Miyata T, et al. *Kidney Int* 51: 1170-1181, 1997)。

#### 7. ペントシジンレベルに及ぼす透析膜の変更の効果

ポリスルホン膜において特異的にペントシジンレベルが低くなる効果を確かめるため、長期間 (> 5 年) AN69 による透析を受けている 3 人の無尿症患者について longitudinal な解析を行った。患者は 10 週間の間、同様の表面積を持つポリスルホンの透析膜 (Fresenius) による透析に変更し、その後 AN69 に再変更した。PS への変更の 2 週間前の透析前試料 (2 試料)、PS 透析期間中の透析前試料 (5 試料)、および AN69 へ戻した後、14~16 週の透析前試料 (2 試料) を採取

した。

PS の透析へ変更後、各患者の蛋白結合型ペントシジンレベルは次第に減少し、AN69 の透析へ戻した後は、PS に変更前の AN69 使用時のレベルまで戻ることが判明した (図 1)。

AN69 から PS による透析に移行した患者の longitudinal な研究において観察されたペントシジンレベルの減少は、cross-sectional な研究において観察された P S 群と AN69 群との間の違いの 1/3 に過ぎない (3.6 に対し 10.4 pmol/mg protein)。この相異は、PS 透析移行による観察が、10 週間しか行われなかったことによることが考えられる。ポリスルフォンが、ペントシジンの生成速度を減少させているとすれば、蛋白結合型ペントシジンの減少がこのように緩やかであったことも説明できると思われる。このような環境下では、蛋白結合型ペントシジンレベルの減少は、そのタンパク質の代謝によってしか起こらないと考えられる。同様の観察が、腎臓移植成功後においてもなされている。このとき、蛋白結合型ペントシジンの減少は、血漿  $\beta 2$  ミクログロブリンの減少と比べ、非常にゆっくりとしか起こらず、蛋白結合型ペントシジンの崩壊が遅いことが示されている (Miyata T, et al. Kidney Int 51: 880-887, 1997; Hricik DE, et al. Clin Transplantation 10: 568-573, 1996)。

〔実施例 2〕 カルボニル化合物トラップ剤固定化担体による血中カルボニル化合物の除去

架橋したポリスチレン樹脂にスルホニルヒドラジン基を結合したもの (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES 社) をカルボニル化合物トラップビーズとして用いて、血中カルボニル化合物の除去効果を検討した。透析患者血漿及びカルボニル化合物トラップビーズを添加した透析患者血漿を 37℃ でインキュベートし、ペントシジンの形成抑制効果を確認した。カルボニル化合物トラップビーズの入ったチューブに、ジメチルスルホキシド 100  $\mu$ l 加え膨潤させた後、濾過滅菌した透析患者の透析前の血漿を添加し、37℃ で 1 週間インキュベートした。インキュベ

ート終了後、ポアサイズ  $0.22\mu\text{m}$  の遠心式フィルター（ミリポア製、UFC30GV00）を用いてビーズを除去した。つぎに、ビーズを除去した溶液  $50\mu\text{l}$  に 10% トリクロル酢酸  $50\mu\text{l}$  を加え、遠心してタンパク質を沈殿させた。タンパク質を  $300\mu\text{l}$  の 5% トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。つぎに、6N HCl を  $100\mu\text{l}$  添加し、 $110^\circ\text{C}$  で 16 時間加熱した後、HPLC でペントシジンを定量した（T. Miyata ら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, T. Miyata ら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358）。

$37^\circ\text{C}$  でインキュベートしたときに生成するペントシジン量を図 2 に示した。カルボニル化合物トラップビーズの添加により、ペントシジンの生成が抑制されることが判明した。また、ペントシジンの生成の抑制は添加したカルボニル化合物トラップビーズの量に依存した。

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を用いて、血中のカルボニル化合物を除去できることが明らかとなった。また、血液透析膜としては、特にポリスルホン膜が、カルボニルストレス状態の改善に好適であることが判明した。

### 〔実施例 3〕 活性炭によるジカルボニル化合物溶液中のカルボニル化合物の除去作用

活性炭（和光純薬製）25mg または 50mg の入ったチューブに、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを PBS(-) に溶解したジカルボニル溶液（各  $100\mu\text{M}$  の濃度）をそれぞれ  $900\mu\text{l}$  添加しローテーターを用いて室温で 19 時間攪拌した。次に、溶液をポアサイズ  $0.22\mu\text{m}$  の遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、濾液中のグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

活性炭 25mg にジカルボニル溶液を  $900\mu\text{l}$  添加した場合、グリオキサールは 71%、メチルグリオキサールは 96%、3-デオキシグルコソンは 97% トラップされた。活性炭 50mg の場合、グリオキサールは 85%、メチルグリオキサールは 98%、



3-デオキシグルコソンは98%トラップされた(図3)。

【実施例4】 活性炭による腹膜透析液中のジカルボニル化合物の除去作用

腹膜透析液は通常、高濃度のブドウ糖を含有することから、滅菌時や保存時にブドウ糖由来のカルボニル化合物が生成し、これらのカルボニル化合物が腹膜透析施工中に生体内に導入され、カルボニルストレス状態の発生の一因となる。そこで、本発明のカルボニル化合物トラップ剤による腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。

活性炭25mgまたは50mgの入ったチューブに、腹膜透析液(バクスター製、ダイアニールPD-4, 1.5)を900 $\mu$ l添加しローテーターを用いて室温で19時間攪拌した。次に、溶液をポアサイズ0.22 $\mu$ mの遠心式濾過チューブ(ミリポア製、UFC30GV00)で濾過し、濾液中のグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

活性炭25mgに腹膜透析液を900 $\mu$ l添加した場合、グリオキサールは56%、メチルグリオキサールは71%、3-デオキシグルコソンは62%トラップされた。活性炭50mgに腹膜透析液を900 $\mu$ l添加した場合、グリオキサールは64%、メチルグリオキサールは78%、3-デオキシグルコソンは77%トラップされた(図4)。

【実施例5】 活性炭による透析患者血漿を37℃でインキュベートしたときのペントシジンの生成抑制効果

PBS(-)に懸濁させた活性炭12mgの入ったチューブに、濾過滅菌した透析患者の透析前の血漿250 $\mu$ lを添加し、37℃で1週間インキュベートした。インキュベーター終了後、遠心後の上清50 $\mu$ lに、12N HClを50 $\mu$ l添加し、110℃で16時間加熱し、加水分解した後、高速液体クロマトグラフィーを用いてペントシジンを定量した(T. Miyata ら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7:1198-1206, T. Miyata ら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:2353-2358)。

37℃でインキュベートしたときに生成するペントシジン量を図5に示した。活性炭の添加により、対照と比較してペントシジンの生成が51%抑制された。この

ことから、ペントシジンの前駆体となるカルボニル化合物が活性炭により吸着されることが示唆された。

〔実施例 6〕 活性炭による血漿中のカルボニル化合物の除去作用

活性炭（和光純薬製）20 mg、または 50mg の入ったチューブに、腎不全患者の血漿を 500  $\mu$ l 添加しローテーターを用いて室温で 12 時間攪拌した。つぎに、遠心により活性炭を分離後、血漿中のグリオキサールとメチルグリオキサール濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

血漿中のグリオキサールとメチルグリオキサール濃度は、以下のようにして測定した。すなわち、血漿 200  $\mu$ l に 0.67M 過塩素酸 300  $\mu$ l を添加して攪拌後、遠心して上清を分離した。この上清 150  $\mu$ l に 1% o-フェニレンジアミン 20  $\mu$ l、内部標準として 10  $\mu$ M の 2,3-ブタンジオン 50  $\mu$ l を加え攪拌後、25℃で 1 時間反応させた。Ohmori らの方法 (Ohmori S, et al. J. Chromatogr. 414: 149-155, 1987) によりグリオキサールあるいはメチルグリオキサールと o-フェニレンジアミンとの反応で生成するキノキサリン誘導体を逆相カラムを用いた HPLC 分離し定量した。

結果は図 6 に示した。血漿に活性炭 20mg を添加することにより、グリオキサールは 58%、メチルグリオキサールは 65% トラップされた。活性炭 50mg を添加した場合には、グリオキサールは 75%、メチルグリオキサールは 80% がトラップされた。

〔実施例 7〕 スルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズ (Ps-TsNHNH<sub>2</sub>) による血漿中のカルボニル化合物の除去作用

スルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズ 10mg、または 20 mg の入ったチューブに、腎不全患者の血漿を 500  $\mu$ l 添加しローテーターを用いて室温で 12 時間攪拌した。つぎに、遠心によりスルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズを分離後〔実施例 6〕と同様の方法により血漿中のグリオキサールとメチルグリオキサール濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。結果は図 6 に

示した。血漿にスルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズ 10mg を添加することにより、グリオキサールは 45 %、メチルグリオキサールは 39 % トラップされた。スルホニルヒドラジン結合ポリスチレンビーズ 20mg を添加した場合には、グリオキサール、メチルグリオキサールともに 75 % がトラップされた。

〔実施例 8〕 アミノグアニジンによる血漿中のカルボニル化合物の除去作用

アミノグアニジンを 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) に溶かした溶液 (50mM, 100mM) 50  $\mu$ l と腎不全患者の血漿を 450  $\mu$ l を混合し室温で 12 時間静置した。12 時間後に血漿中のグリオキサールとメチルグリオキサール濃度を〔実施例 6〕と同様の方法により高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

結果は図 7 に示した。血漿のアミノグアニジン濃度が 5mM のとき、グリオキサールは 50 %、メチルグリオキサールは 46 % トラップされた。アミノグアニジン濃度が 10mM の場合には、グリオキサールは 58 %、メチルグリオキサールは 70 % がトラップされた。

〔実施例 9〕 カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体によるカルボニル化合物の除去作用

カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体によるカルボニル化合物の除去作用を、ジアミノグアニジン結合ポリアミドを用いて検討した。ジアミノグアニジン結合ポリアミドは、ポリアミドにエピクロルヒドリンを反応させた後、ジアミノグアニジンの水溶液 (pH 12) を添加し 80℃ で約 1 時間反応させることにより作製した (図 8)。反応後、得られたジアミノグアニジン結合ポリアミドを水で洗浄し乾燥させたのち、実験に用いた。

PBS (pH 7.4) に溶かしたジカルボニル化合物溶液 (グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン各 1  $\mu$ M) 1ml を、ジアミノグアニジン結合ポリアミド 30mg を含むチューブに添加し、ローテーターを用いて室温 (25℃) で 5 時間攪拌した。溶液 100  $\mu$ l を遠心し、上清に残留したグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの濃度を、これらを誘導体に転換したの

ち、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。結果を図9に示した。グリオキサールは30%、メチルグリオキサールは56%、3-デオキシグルコソンは11%がトラップされた。同じ条件下で、ジアミノグアニジンを結合していないポリアミドをネガティブコントロールとして用いた場合、上記カルボニル化合物に対するトラップ作用は観察されなかった。

以上の結果から、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体により、効果的に液体中のカルボニル化合物を除去できることが確認された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、血中のカルボニル化合物を効果的に取り除くことができる。本発明のカルボニルストレス状態改善剤は、血液透析用透析膜に固定化することにより、またはその他の担体に固定化して血液回路内に配置することにより簡単に実施することができる。これにより、腎不全患者等を苦しめていたカルボニル化合物による障害（カルボニルストレス）を改善することが可能となる。

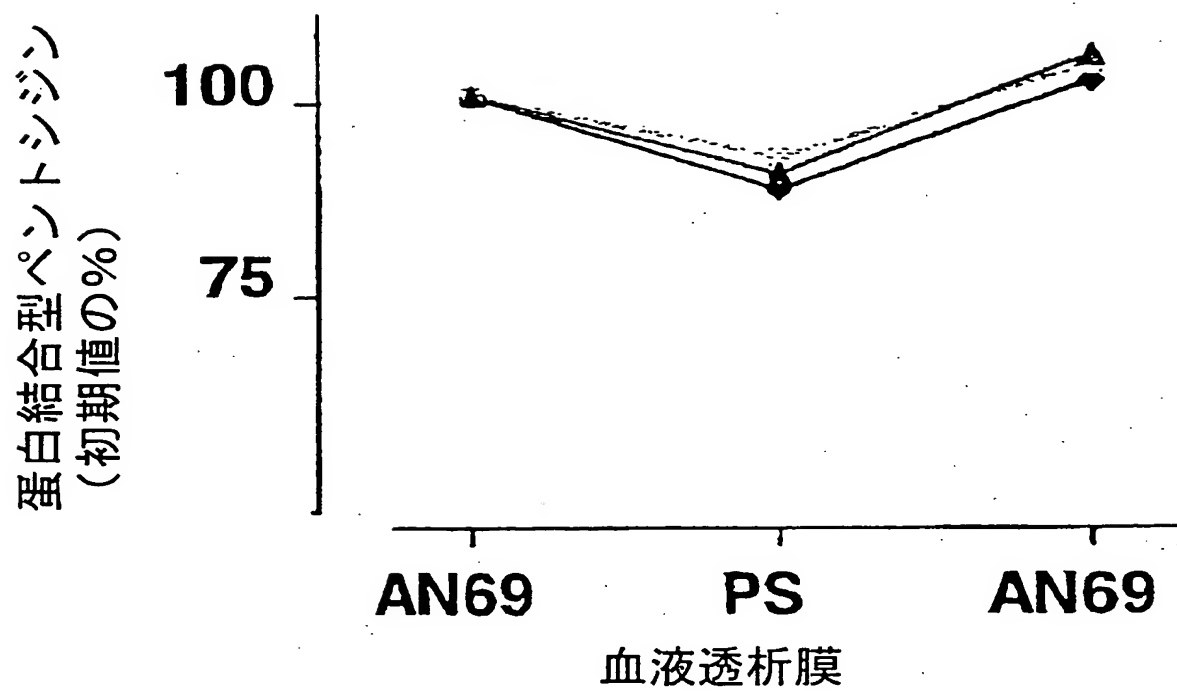
## 請求の範囲

1. 血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤。
2. 血液透析に用いるための、請求項 1 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
3. カルボニル化合物トラップ剤が、血液に不溶性の担体に固定化されたものである請求項 1 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
4. 担体が透析膜である、請求項 3 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
5. 透析膜がポリスルホン膜である、請求項 4 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
6. カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 1 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
7. メイラード反応阻害剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、SH基含有化合物、およびそれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 つの化合物である、請求項 6 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
8. カルボニル化合物トラップ剤が、血液に不溶性の化合物からなることを特徴とする請求項 1 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
9. 血液に不溶性の化合物が、イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲル、アルミナ、および炭酸カルシウムからなる群から選択された少なくとも 1 つの化合物である、請求項 8 に記載のカルボニル化合物トラップ剤。
10. カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、生体のカルボニルストレス状態改善剤。
11. カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、血液におけるカルボニルストレス状態改善剤。
12. 血液回路内に固定化するための、請求項 11 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
13. カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 11 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

14. メイラード反応阻害剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、SH基含有化合物、およびそれらの誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの化合物である、請求項13に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
15. 患者血液を血液回路内においてカルボニル化合物トラップ剤に接触させる工程を含む、カルボニルストレス状態の改善方法。
16. カルボニル化合物トラップ剤が血液に不溶性の担体に固定化されていることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

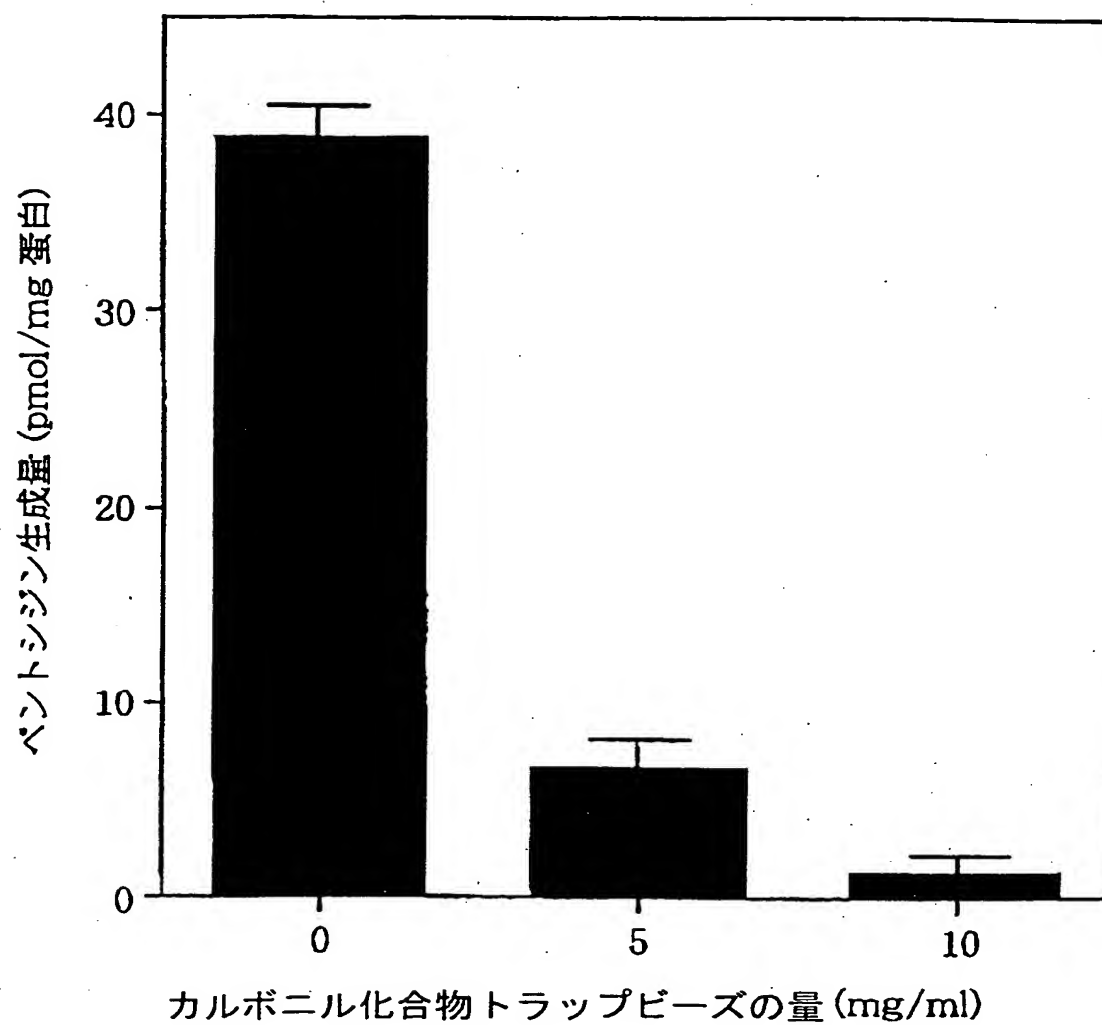
1 / 9

図 1



2 / 9

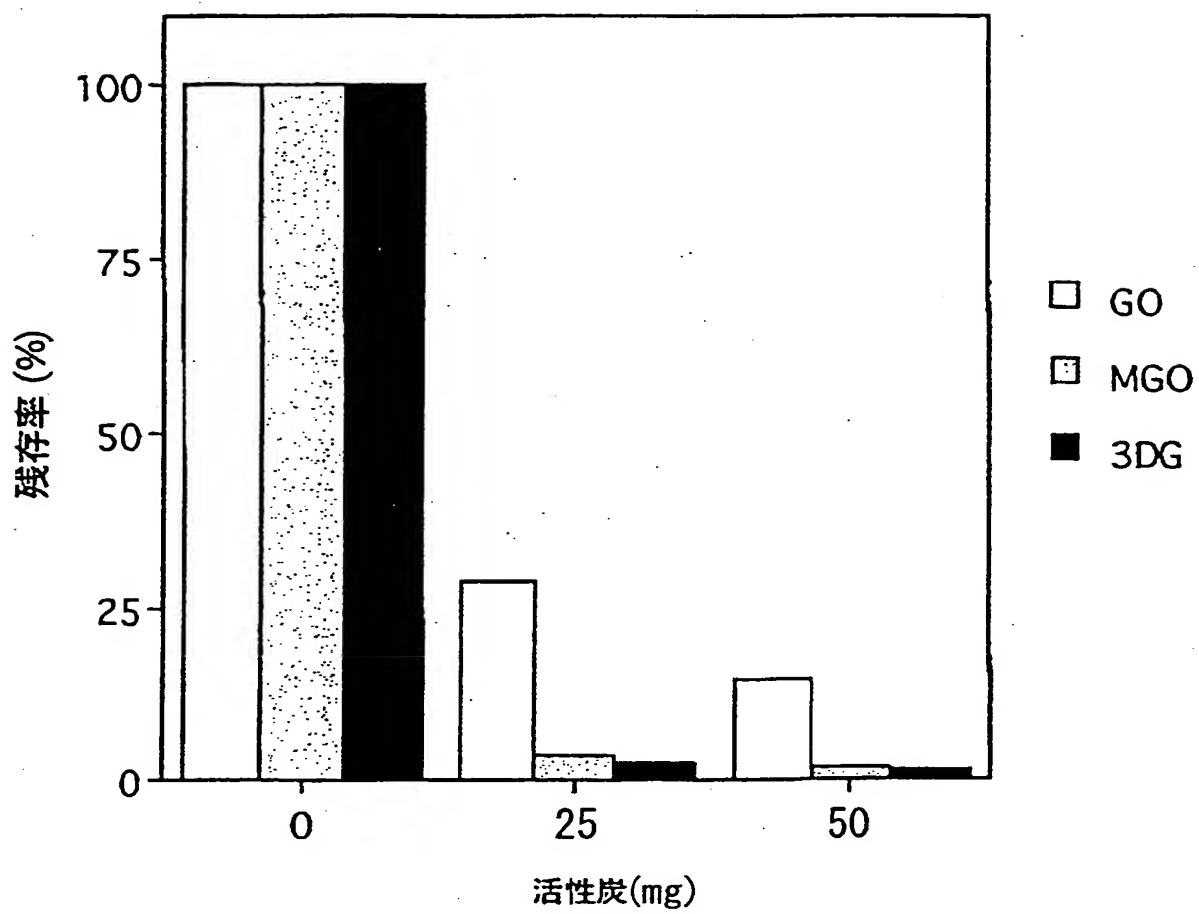
図 2





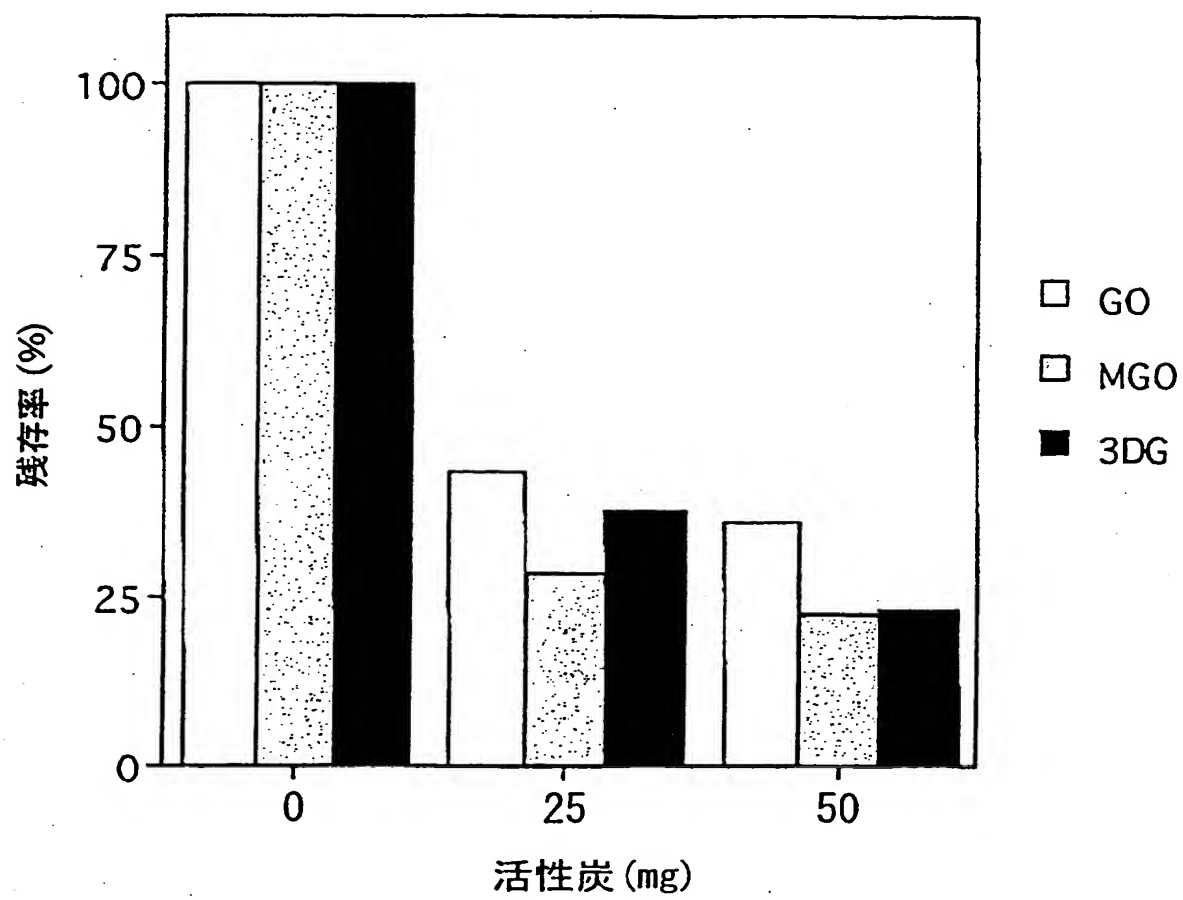
3 / 9

図 3



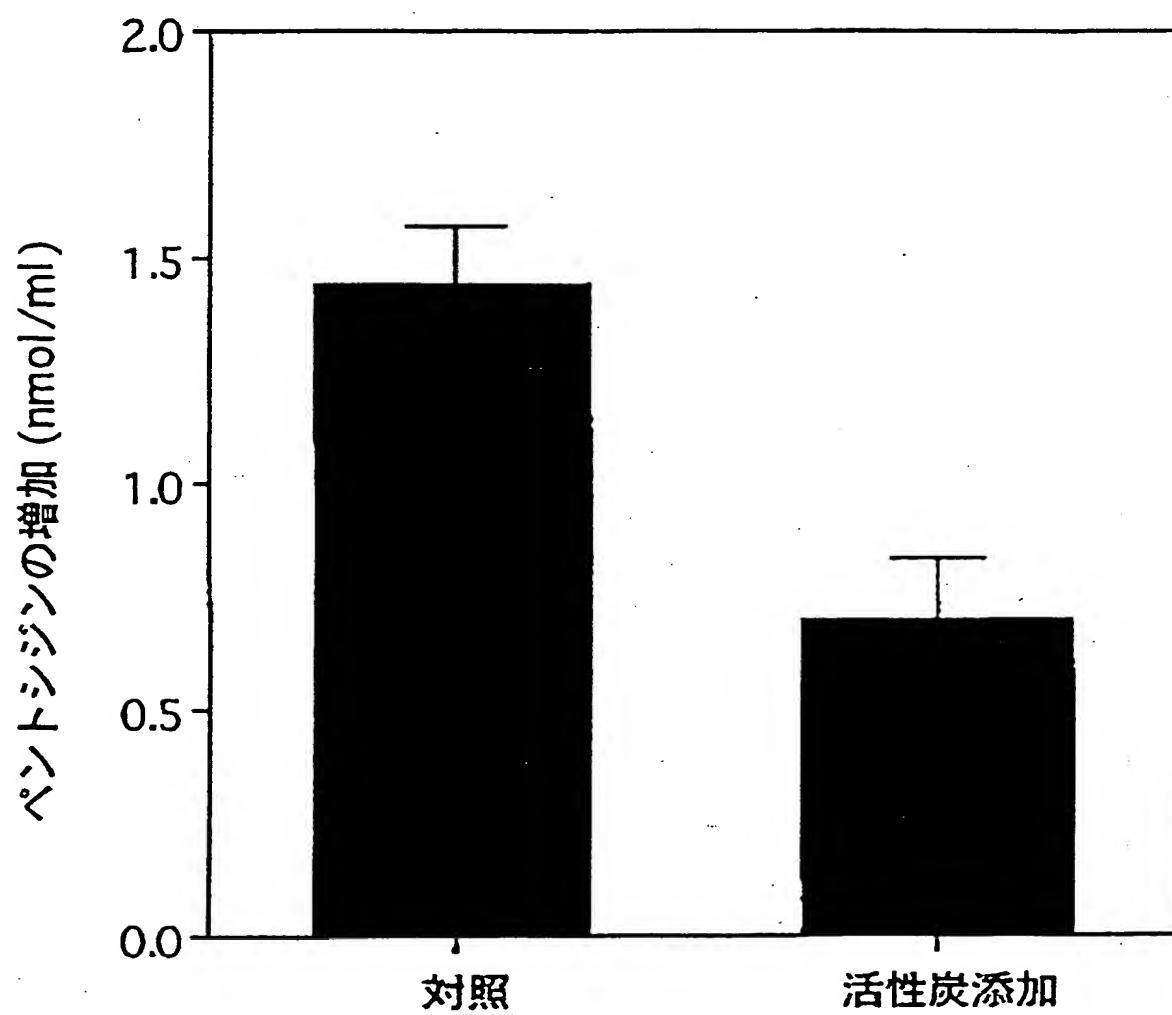
4 / 9

図 4



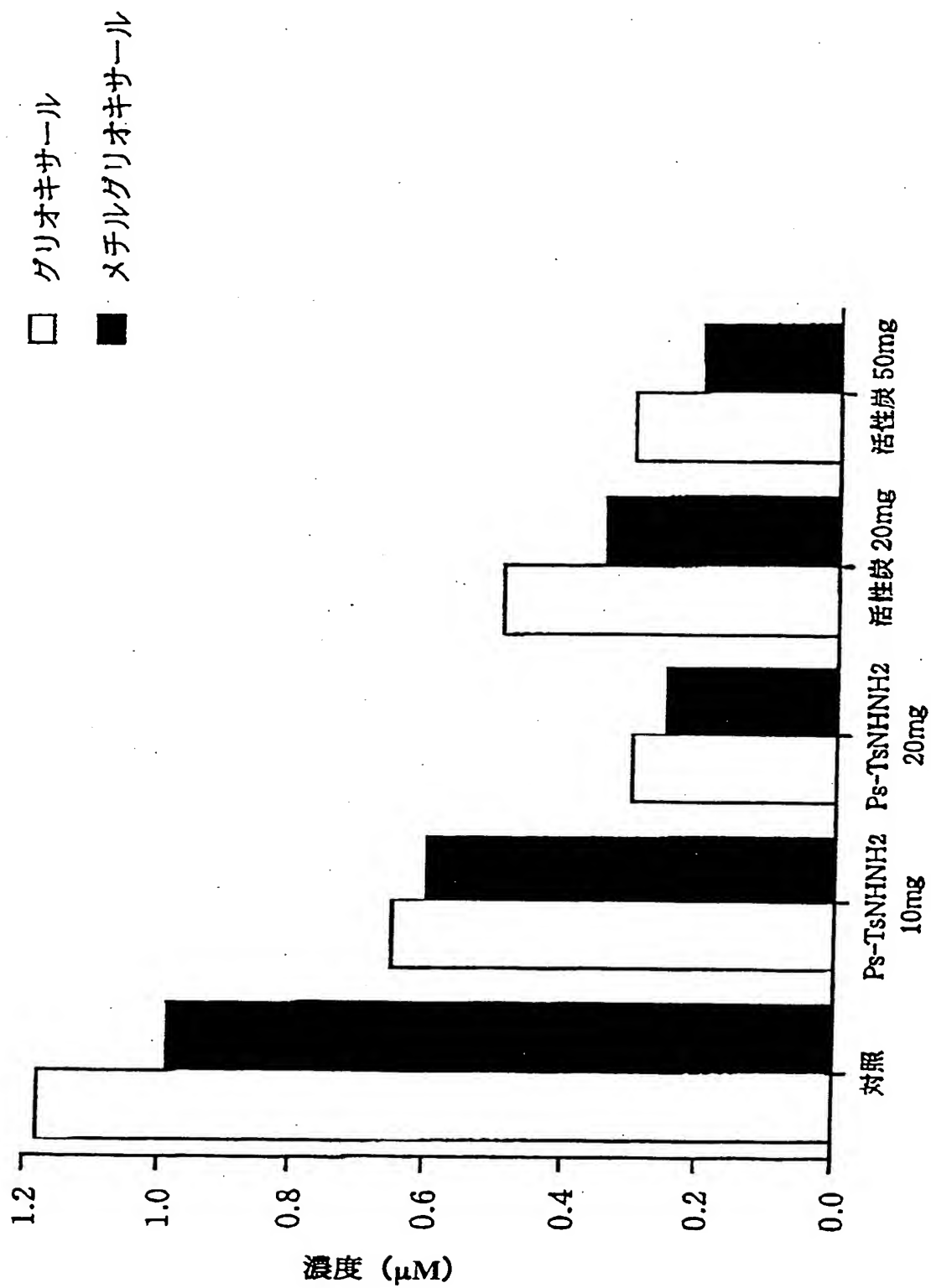
5 / 9

図 5



6 / 9

図 6



7 / 9

図 7

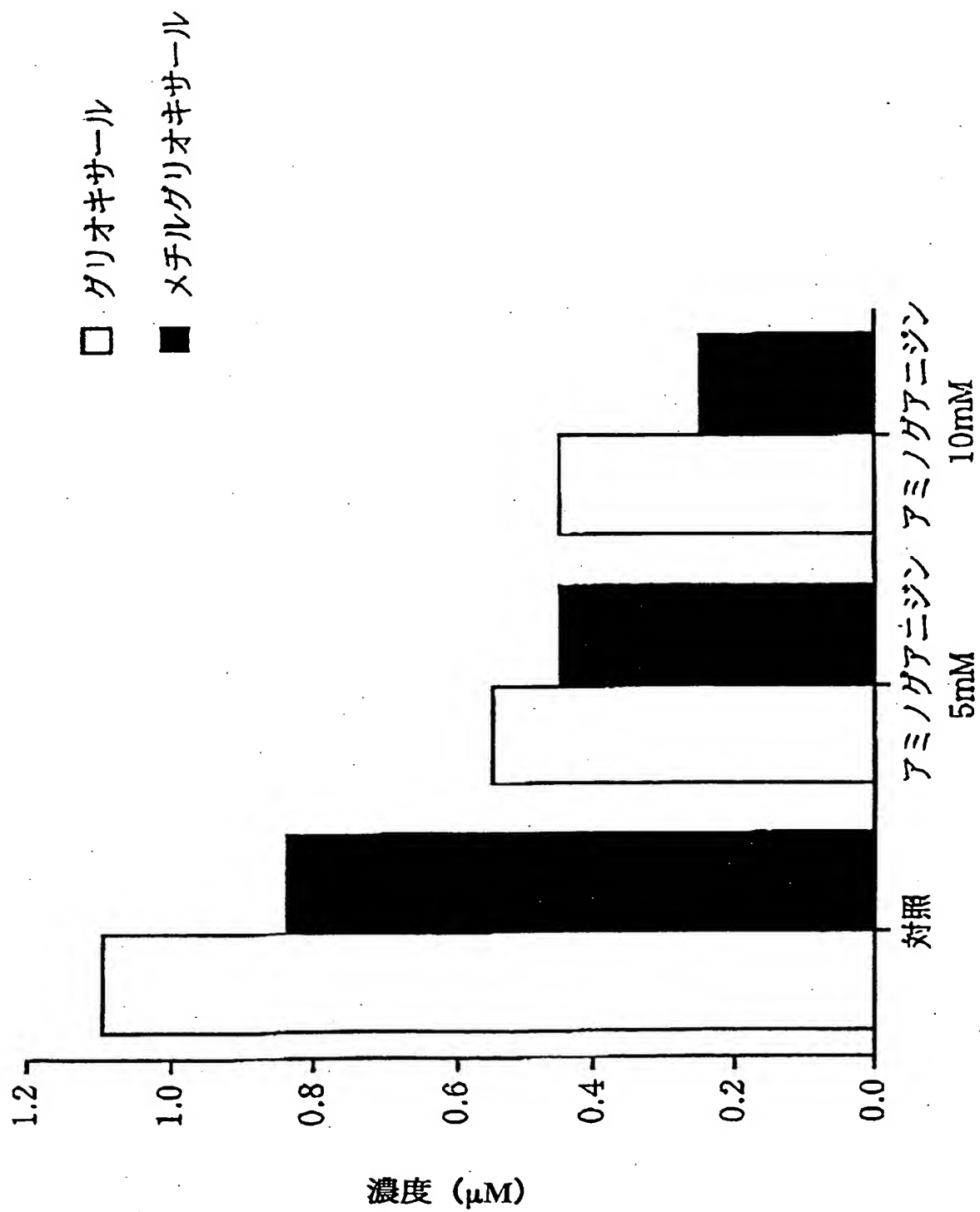


図 8

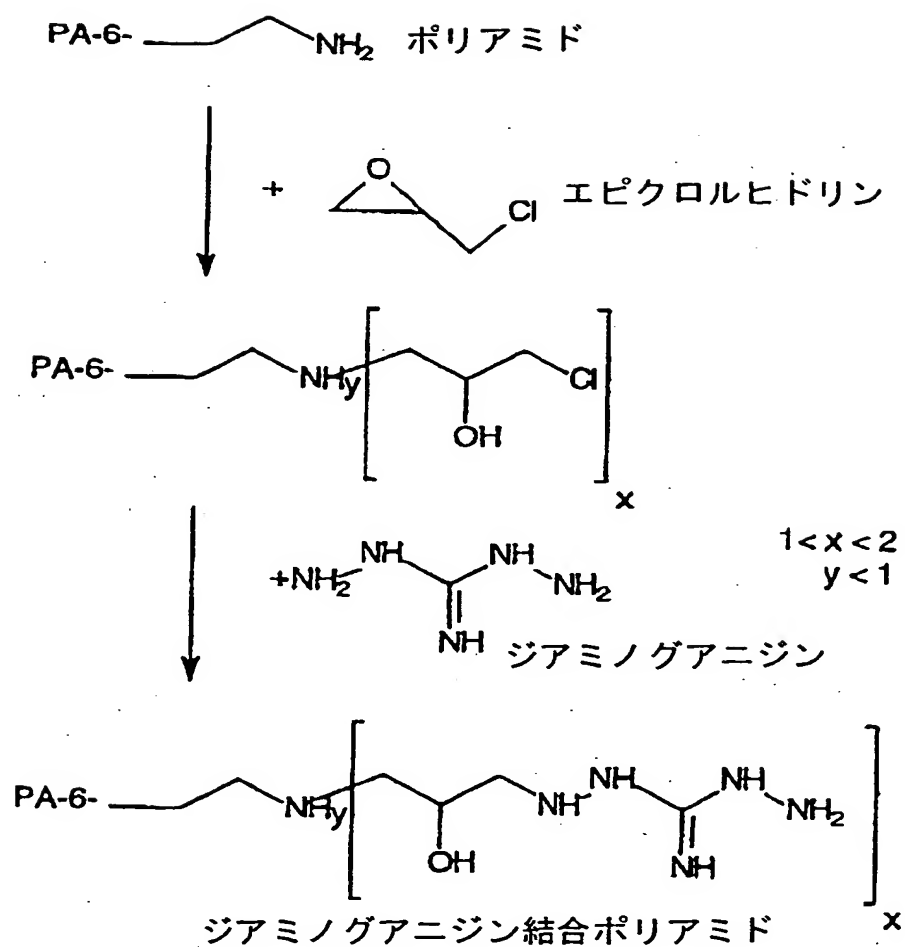
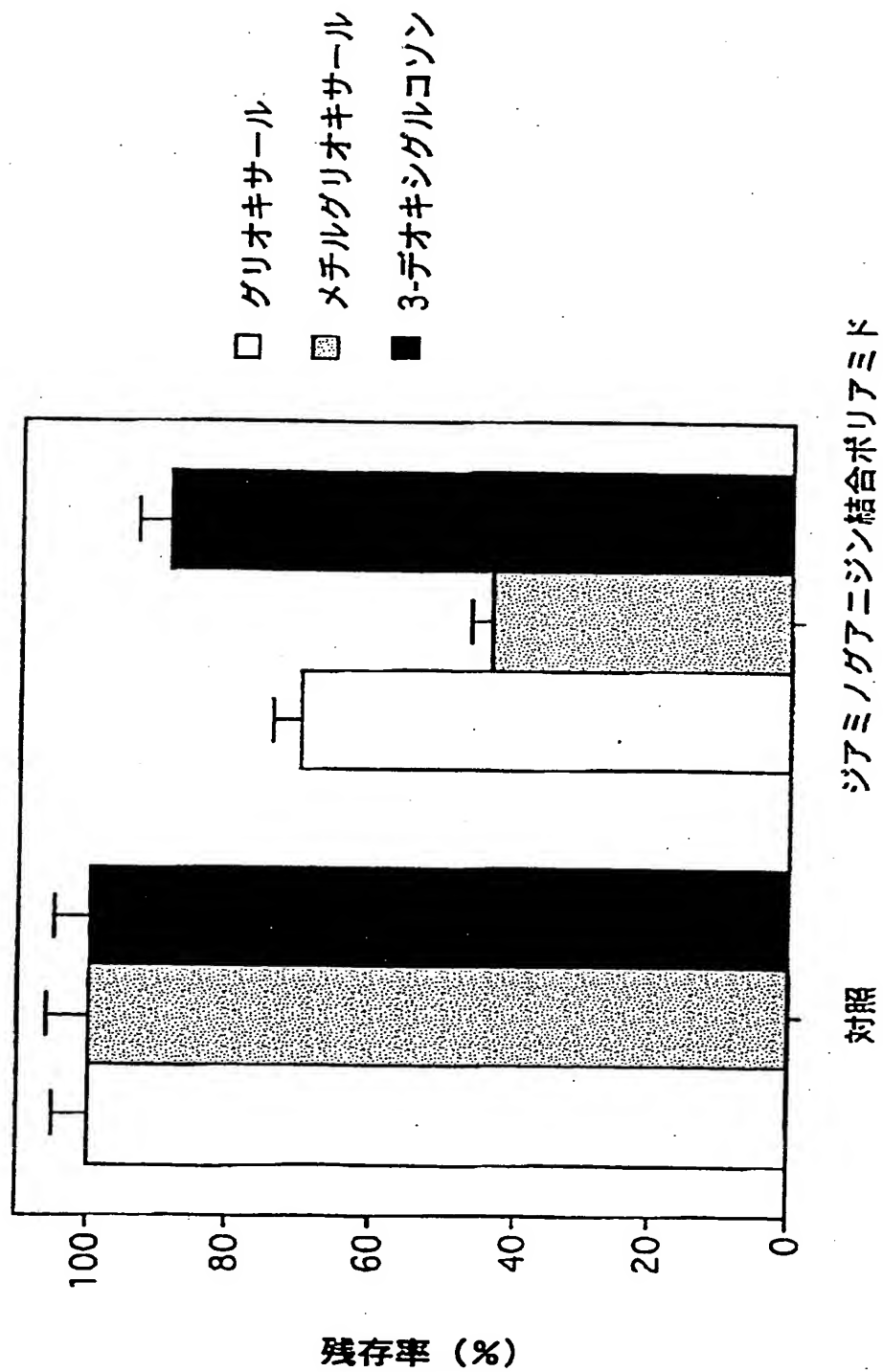


図 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03029

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/155, 31/095, 31/44, 31/74, 33/00,  
33/08, 33/44, 38/06, 31/198, A61M1/16, 1/36, A61P7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/155, 31/095, 31/44, 31/74, 33/00,  
33/08, 33/44, 38/06, 31/198, A61M1/16, 1/36, A61P7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), MEDLIN (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	MIYATA, Toshio et al, "2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of rat carotid artery: role of glycooxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage", FEBS Lett. Feb. 1999, Vol.445, No.1, pages 202-206, especially, see Abstract, page 205, left column, line 44 to right column, line 14	1, 2, 10 9-14
X Y	FISHBANE, S et al, "Reduction of plasma apolipoprotein-B by effective removal of circulating glycation derivatives in uremia." KIDNEY INTERNATIONAL, 1997, Vol.52, No.6, pages 1645-50, especially, see Summary	1, 2 3-5
X Y	FEATHER, M. S. et al, "The use of aminoguanidine to trap and measure dicarbonyl intermediates produced during the Maillard reaction", ACS Symp. Ser., 1996, Vol.631 (Chemical Markers for Processed and Stored Foods), pages 24-31, especially, see Summary	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	BOOTH, A. A. et al, "In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs)",	1, 2, 6 3-5, 10-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 August, 2000 (08.08.00)

Date of mailing of the international search report  
29 August, 2000 (29.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03029

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15,16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to subject matters which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03029

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.9, pages 5430-7, especially, see Summary	
X Y	NIWA, Toshimitsu et al, "Modification of $\beta$ 2m with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulating in uremic serum, Kidney International", 1996, Vol.49, No.3, pages 861-867, Abstract; page 863, right column, line 50 to page 864, left column, line 4	1,2,6 3-5,10-14
X Y	US, 3793187, A (Erdoelchemie Gesellschaft mit beschränkter Haftung), 19 February, 1974 (19.02.74), Abstract; page 2, right column, lines 14-21 & DE, 2141469, A1 & GB, 1368172, A & FR, 2149569, A1 & JP, 48029702, A	1,2,6 3-5,10-14
X Y	UNGAR, F. et al, "Inhibition of binding of aldehydes of biogenic amines in tissues", Biochemical Pharmacology, 1973, Vol.22, No.15, pages 1905-1913, especially, see Summary	1,2,6 3-5,10-14
X Y	JARRET, M. et al, "Elimination of glyoxal and glyoxylic acid by granular activated carbon filtration", Sci. Eau, 1986, Vol.5, No.4, pages 377-400, especially, see Summary	1,2,6 3-5,10-14
X Y	US, 3284531, A (The Dow Chemical Company), 08 November, 1966 (08.11.66), whole document (Family: none)	1,2,8,9 3-5
X	CHAUDHURI, Swades Kumar, "Removal of carbonyl sulfide from a liquid hydrocarbon with activated alumina", Sep. Technol., 1992, Vol.2, No.2, pages 58-61, especially, see Summary	1,2,8,9 3-5

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/03029

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/155, 31/095, 31/44, 31/74, 33/00, 33/08, 33/44, 38/06, 31/198, A61M1/16, 1/36, A61P7/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/155, 31/095, 31/44, 31/74, 33/00, 33/08, 33/44, 38/06, 31/198, A61M1/16, 1/36, A61P7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLIN (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	MIYATA, Toshio et al, "2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of rat carotid artery: role of glycooxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage", FEBS Lett. Feb. 1999, Vol. 445, No. 1, pp. 202-206 特に、Abstract, 第205ページ左欄第44行—右欄第14行	1, 2, 10 9-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.08.00

国際調査報告の発送日

29.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一



4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15, 16 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲15, 16は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	FISHBANE, S et al, "Reduction of plasma apolipoprotein-B by effective removal of circulating glycation derivatives in uremia." KIDNEY INTERNATIONAL, 1997, Vol. 52, No. 6, pp. 1645-50、特に、Summary	1, 2 3-5
X Y	FEATHER, M. S. et al, "The use of aminoguanidine to trap and measure dicarbonyl intermediates produced during the Maillard reaction", ACS Symp. Ser., 1996, Vol. 631 (Chemical Markers for Processed and Stored Foods), pp. 24-31 特に、Summary	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	BOOTH, A. A. et al, "In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol. 272, No. 9, pp. 5430-7 特に、Summary	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	NIWA, Toshimitsu et al, "Modification of $\beta_2m$ with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulating in uremic serum, Kidney International", 1996, Vol. 49, No. 3, pp. 861-867, Abstract, 第863ページ右欄第50行-第864ページ左欄第4行	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	US, 3 7 9 3 1 8 7, A (Erdoelchemie Gesellschaft mit beschränkter Haftung) 19. 2月. 1974 (19. 02. 74) ABSTRACT, 第2ページ右欄第14-21行 DE, 2 1 4 1 4 6 9, A 1 & GB, 1 3 6 8 1 7 2, A & FR, 2 1 4 9 5 6 9, A 1 & JP, 4 8 0 2 9 7 0 2, A	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	UNGAR, F. et al, "Inhibition of binding of aldehydes of biogenic amines in tissues", Biochemical Pharmacology, 1973, Vol. 22, No. 15, pp. 1905-1913, 特に、Summary	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	JARRET, M. et al, "Elimination of glyoxal and glyoxylic acid by granular activated carbon filtration", Sci. Eau, 1986, Vol. 5, No. 4, pp. 377-400, 特に、Summary	1, 2, 6 3-5, 10-14
X Y	US, 3 2 8 4 5 3 1, A (The Dow Chemical Company) 08. 11月. 1966 (08. 11. 66) 文献全体 ファミリーなし	1, 2, 8, 9 3-5
X Y	CHAUDHURI, Swades Kumar, "Removal of carbonyl sulfide from a liquid hydrocarbon with activated alumina", Sep. Technol., 1992, Vol. 2, No. 2, pp. 58-61, 特に、Summary	1, 2, 8, 9 3-5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 00/10606, A1 (黒川 清) 02. 3月. 2000 (02. 03. 00) Abstract, 請求の範囲 ファミリーなし	1-14
X Y	WO, 96/31537, A1 (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 05. 4月. 1 996 (05. 04. 96) & EP, 827511, A1 & US, 5855882, A & US, 5861238, A & US, 5962245, A & JP, 11-5 04316, A) Abstract, 第3ページ第24行-第4ページ第6行	1,2 3-5

## DESCRIPTION

### BLOOD CARBONYL COMPOUND-TRAPPING AGENT

#### 5 Technical Field

The present invention relates to the removal of blood carbonyl compounds, specifically, to the removal of blood carbonyl compounds using a carbonyl compound-trapping agent.

#### 10 Background Art

Hemodialysis is a typical therapy used for treating patients with chronic renal failure, wherein blood waste products and toxic substances are removed by contacting blood with a dialysate via a semipermeable membrane. However, the disease state of renal failure cannot completely be inhibited by dialysis. Such a disease state includes increase of advanced glycation end products (AGEs) and carbonyl intermediate (precursors of AGE) levels in renal failure patients. AGEs have been reported to modify protein structure and function and to be involved in the onset of complications of dialysis, such as dialysis amyloidosis and arteriosclerosis (Makita, Z. et al., N. Engl. J. Med., 325: 836-842, 1991; Miyata, T. et al., J. Clin. Invest., 92: 1243-1252, 1993; Miyata, T. et al., J. Clin. Invest., 93: 521-528, 1994; Miyata, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358, 1996; Horie, K. et al., J. Clin. Invest., 100: 2995-3004, 1997; Miyata, T. et al., FEBS letters, 445: 202-206, 1999). Recently, it was revealed that the accumulation of carbonyl intermediates such as glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxy glucosone and arabinose (so-called, carbonyl stress) (Odani et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 256: 89-93, 1999; Niwa et al., Nephron, 69: 438-443, 1995; Miyata et al., Kidney Int., 55: 389-399, 1999; Miyata et al., J. Am. Soc. Nephrol., 9: 2349-2356, 1998) in blood plasma results in an increased AGE level in renal failure (Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 9: 2349-2356, 1998; Miyata, T. et al., Kidney Int., 55: 389-399, 1999). A variety of carbonyl intermediates (AGE precursors) derive mainly from carbohydrates and lipids (Miyata, T. et al., Kidney Int., 55: 389-399, 1999; Miyata, T. et al., Kidney Int., 54: 1290-1295, 1998;

Miyata, T. et al., Kidney Int., 51: 1170-1181, 1997). Conventional hemodialysis cannot effectively remedy these increased levels of AGE and carbonyl intermediates, namely "carbonyl stress", in renal failure patients.

5

#### Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide a carbonyl compound-trapping agent for removing blood carbonyl compounds. Another objective of the present invention is to provide a method and agent for improving carbonyl stress state in a living body. The present invention enables to prevent the damage caused by carbonyl compounds in hemodialysis patients who are particularly prone to fall into a carbonyl stress state. The objective of the present invention is to reduce the damage by carbonyl compounds as much as possible in hemodialysis patients.

First, the present inventors studied how the hemodialysis membrane used for hemodialysis influenced the quantity of carbonyl compounds in patients' blood. The content of blood pentosidine, a marker for the accumulation of carbonyl intermediate products (i.e. carbonyl stress), was compared by quantification with high-performance liquid chromatography (HPLC) for each type of dialysis membrane used by dialysis patients. The result showed that free pentosidine was markedly removed by dialysis through any dialysis membrane, while protein-bound pentosidine, which occupies the major portion of pentosidine in the body could not be effectively removed by dialysis.

Comparing the type of dialysis membrane indicated no difference in the value of protein-bound and free pentosidine with low-flux cellulosic, high-flux polymethyl methacrylate (PMMA) and AN69, but the value was lower with high-flux polysulfone (PS) ( $p < 0.01$ ). There were no differences of the value depending on whether the patient was Japanese or Belgian, or on the manufacturer of the PS membrane. Switching the dialysis membrane used by three patients from AN69 to PS decreased the protein-bound pentosidine level, and then, return to AN69 increased the level back to the original. These results revealed that polysulfone membrane is effective as a dialysis membrane for suppressing the generation of



carbonyl compounds.

Then, the present inventors conceived the utilization of a carbonyl compound-trapping agent for the effective removal of blood carbonyl compounds. Blood plasma prepared from the blood of dialysis patients was incubated with carriers on which a carbonyl compound-trapping agent had been immobilized, and blood carbonyl compounds were quantified. The result showed that the incubation with carriers on which a carbonyl compound-trapping agent had been immobilized significantly reduced the quantities of blood carbonyl compounds.

Based on these findings, the present inventors focused on carbonyl compounds accumulated in blood and thought that the removal of carbonyl compounds accumulated in blood was required for improving carbonyl stress, mainly protein modification, in dialysis patients. Then, the inventors found that the use of a compound having the function of eliminating or reducing the protein modification activity of carbonyl compounds by chemically reacting with or adsorbing carbonyl compounds was effective to achieve the objective, and thus completed the present invention. In the present invention, a carrier, on which a compound having such a function has been immobilized, or the compound itself, is called a "carbonyl compound-trapping agent".

Namely, the present invention relates to a carbonyl compound-trapping agent for removing blood carbonyl compounds, as well as a method and agent for improving carbonyl stress state in a living body as described below:

- (1) a carbonyl compound-trapping agent that removes a blood carbonyl compound;
- (2) the carbonyl compound-trapping agent according to (1), wherein said agent is used in hemodialysis;
- (3) the carbonyl compound-trapping agent according to (1), wherein said agent is immobilized on a blood-insoluble carrier;
- (4) the carbonyl compound-trapping agent according to (3), wherein said carrier is a dialysis membrane;
- (5) the carbonyl compound-trapping agent according to (4), wherein said dialysis membrane is a polysulfone membrane;
- (6) the carbonyl compound-trapping agent according to (1), wherein

said carbonyl compound-trapping agent is a Maillard reaction inhibitor;

(7) the carbonyl compound-trapping agent according to (6), wherein said Maillard reaction inhibitor comprises at least one compound selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, SH group-containing compound, and derivatives thereof;

(8) the carbonyl compound-trapping agent according to (1), wherein said agent comprises a compound that is insoluble in blood;

(9) the carbonyl compound-trapping agent according to (8), wherein said compound that is insoluble in blood comprises at least one compound selected from the group consisting of an ion exchange resin, activated carbon, silica gel, alumina, and calcium carbonate;

(10) an agent for improving the carbonyl stress state in a living body, wherein said agent comprises a carbonyl compound-trapping agent as an active ingredient;

(11) an agent for improving the carbonyl stress state in blood, wherein said agent comprises a carbonyl compound-trapping agent as an active ingredient;

(12) the agent for improving the carbonyl stress state according to (11), wherein said agent is immobilized within the blood circuit;

(13) the agent for improving the carbonyl stress state according to (11), wherein the carbonyl compound-trapping agent is a Maillard reaction inhibitor;

(14) the agent for improving the carbonyl stress state according to (13), wherein said Maillard reaction inhibitor comprises at least one compound selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, SH group-containing compound, and derivatives thereof;

(15) a method for improving carbonyl stress state, wherein said method comprises the step of contacting, within the blood circuit, a patient's blood with a carbonyl compound-trapping agent;

(16) the method according to (15), wherein said method comprises the step of immobilizing said carbonyl compound-trapping agent on a blood-insoluble carrier.

The present invention also relates to the use of a carbonyl compound-trapping agent for removing blood carbonyl compounds. Further, the present invention relates to the use of a carbonyl

compound-trapping agent for manufacturing an agent for improving blood carbonyl stress.

In the present invention, carbonyl compounds to be trapped include, for example, the following compounds that accumulate in the blood of renal failure patients together with oxidative stress. Carbonyl compounds derived from carbohydrates:

- arabinose
- glyoxal
- methylglyoxal
- 3-deoxyglucosone

Carbonyl compound derived from ascorbic acid:

- dehydroascorbic acid

Carbonyl compound derived from lipid:

- hydroxynonenal
- malondialdehyde
- acrolein

A preferred carbonyl compound-trapping agent in the present invention is one capable of completely inhibiting or reducing the protein-modification activity of all these carbonyl compounds through a chemical reaction or adsorption. However, the carbonyl compound-trapping agent of the present invention also includes an agent effective for the major carbonyl compounds among these. Carbonyl compound-trapping agents that can be used in the present invention include, for example, the following compounds:

- aminoguanidine (Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))
- $\pm$  2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195; S. Nakamura, 1997, Diabetes 46:895-899)

Further, the carbonyl compound-trapping agent includes, for example, the following compounds or derivatives thereof that are capable of functioning as carbonyl compound-trapping agents.

"Derivatives" indicate compounds having an atomic or molecular substitution(s) at any position as compared with the parent compound. By linking to carriers to facilitate separation from blood, these compounds can be used as carbonyl compound-trapping agents in the present invention. Alternatively, if the compound itself is insoluble in blood, it can be used as the carbonyl compound-trapping

agent of this invention without being immobilized on carriers.

(1) guanidine derivatives such as methylguanidine (JP-A Sho 62-142114; JP-A Sho 62-249908; JP-A Hei 1-56614; JP-A Hei 1-83059; JP-A Hei 2-156; JP-A Hei 2-765; JP-A Hei 2-42053; JP-A Hei 6-9380; 5 Published Japanese Translation of International Publication 5-505189), etc.

(2) hydrazine derivatives such as sulfonylhydrazine, etc.

(3) five-membered heterocyclic compounds having two nitrogen atoms, such as pyrazolone (JP-A Hei 6-287179), pyrazoline (JP-A 10 Hei10-167965), pyrazole (JP-A Hei 6-192089; JP-A Hei6-298737; JP-A Hei 6-298738), imidazolidine (JP-A Hei 5-201993; JP-A Hei 6-135968; JP-A Hei7-133264; JP-A Hei 10-182460), hydantoin (JP-A Hei 6-135968), etc.

(4) five-membered heterocyclic compounds having three 15 nitrogen atoms, such as triazole (JP-A Hei 6-192089), etc.

(5) five-membered heterocyclic compounds having a nitrogen atom and a sulfur atom, such as thiazoline (JP-A Hei 10-167965), thiazole (JP-A Hei 4-9375; JP-A Hei 9-59258), thiazolidine (JP-A Hei 5-201993; JP-A Hei 3-261772; JP-A Hei 7-133264; JP-A Hei 20 8-157473), etc.

(6) five-membered heterocyclic compounds having a nitrogen atom and an oxygen atom, such as oxazole (JP-A Hei 9-59258), etc.

(7) nitrogen-containing six-membered heterocyclic compounds such as pyridine (JP-A Hei 10-158244; JP-A Hei 10-175954), and 5 pyrimidine (Published Japanese Translation of International Publication 7-500811), etc.

(8) nitrogen-containing condensed heterocyclic compounds such as indazole (JP-A Hei 6-287180), benzimidazole (JP-A Hei 6-305964), quinoline (JP-A Hei 3-161441), etc.

30 (9) sulfur- and nitrogen-containing condensed heterocyclic compounds such as benzothiazole (JP-A Hei 6-305964), etc.

(10) sulfur-containing condensed heterocyclic compound such as benzothiophene (JP-A Hei 7-196498), etc.

35 (11) oxygen-containing condensed heterocyclic compounds such as benzopyran (JP-A Hei 3-204874; JP-A Hei 4-308586), etc.

(12) nitrogenous compounds such as carbazoyl (JP-A Hei 2-156; JP-A Hei 2-753), carbazic acid (JP-A Hei 2-167264), hydrazine (JP-A

Hei 3-148220), etc.

(13) quinones such as benzoquinone (JP-A Hei 9-315960), and hydroquinone (JP-A Hei 5-9114), etc.

5 (14) aliphatic dicarboxylic acids (JP-A Hei 1-56614; JP-A Hei 5-310565)

(15) silicone containing compounds (JP-A Sho 62-249709)

(16) organic germanium compounds (JP-A Hei 2-62885; JP-A Hei 5-255130; JP-A Hei 7-247296; JP-A Hei 8-59485)

10 (17) flavonoids (JP-A Hei 3-240725; JP-A Hei 7-206838; JP-A Hei 9-241165; WO 94/04520)

(18) alkylamines (JP-A Hei 6-206818; JP-A Hei 9-59233; JP-A Hei 9-40626; JP-A Hei 9-124471)

15 (19) amino acids (Published Japanese Translation of International Publication 4-502611; Published Japanese Translation of International Publication 7-503713)

(20) aromatic compounds such as ascochlorin (JP-A Hei 6-305959), benzoic acid (WO 91/11997), pyrrolo-naphthyridinium (JP-A Hei 10-158265), etc.

20 (21) polypeptides (Published Japanese Translation of International Publication 7-500580)

(22) vitamins such as pyridoxamine (WO 97/09981), etc.

(23) SH group-containing compounds such as glutathione, cysteine, N-acetylcysteine, etc.

(24) SH group-containing proteins such as reduced albumin, etc.

5 (25) tetracyclines (JP-A Hei 6-256280)

(26) chitosans (JP-A Hei 9-221427)

(27) tannins (JP-A Hei 9-40519)

(28) quaternary ammonium ion-containing compounds

(29) biguanides such as metformin, phenformin and buformin

30 (30) polymer compounds such as ion exchange resins

(31) inorganic compounds such as activated carbon, silica gel, alumina and calcium carbonate.

Most of the above compounds are generally known as Maillard reaction inhibitors. Maillard reaction means a non-enzymatic glycation reaction between a reducing sugar such as glucose, and an amino acid or protein. Focusing on a phenomenon of brown coloration in a mixture consisting of amino acid and reducing sugar

35

upon heating, Maillard reported this reaction in 1912 (Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912)). Maillard reaction is involved in brown coloration of food, generation of aromatic components and taste, and protein denaturation during heating or storage. Therefore, this reaction has been mainly studied in the field of food chemistry.

In 1968, glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), a micro fraction of hemoglobin, was identified *in vivo*, which was found to increase in patients with diabetes (Rahbar. S., Clin. Chim. Acta, 22: 296 (1968)). These findings helped launch a wave of interest in the significance of the *in vivo* Maillard reaction and the participation of the reaction in the onset of adult diseases, such as diabetic complications and arteriosclerosis as well as the progress of aging. Agents inhibiting the *in vivo* Maillard reaction were explored intensively, resulting in the discovery of the above-mentioned compounds as agents inhibiting the Maillard reaction.

However, it was not known that such Maillard reaction inhibitors are capable of improving the carbonyl-stress state in peritoneal-dialysis patients by eliminating carbonyl compounds from the blood.

There is no particular limitation on the type of carrier to be used for the immobilization of the carbonyl compound-trapping agent of the present invention, as long as it is insoluble in blood and harmless to the human body, and is also safe and stable as a material directly contacting blood. Specifically, such carriers include, for example, synthetic or naturally occurring organic polymer compounds, inorganic materials such as glass beads, silica gel, alumina, and activated carbon, and those of which surfaces are coated with polysaccharide or synthetic polymer.

A carrier comprising a polymer compounds is exemplified by a polymethyl methacrylate, polyacrylonitrile, polysulfone, vinyl, polyolefin, fluorine, polyester, polyamide, polyimide, polyurethane, polyacryl, polystyrene, polyketone, silicon, cellulose, chitosan; specifically, polysaccharides such as agarose, cellulose, chitin, chitosan, sepharose, dextran, etc. and derivatives thereof, and polyester, polyvinyl chloride, polystyrene, polysulfone, polyethersulfone, polypropylene,

polyvinyl alcohol, polyarylether sulfone, polyacrylic ester, polymethacrylic ester, polycarbonate, acetylated cellulose, polyacrylonitrile, polyethylene terephthalate, polyamide, silicone resin, fluororesin, polyurethane, polyetherurethane, and  
5 polyacrylamide and derivatives thereof. These polymer materials can be used alone or in a combination of two or more types of polymers. In the latter case, the carbonyl compound-trapping agent is immobilized on at least one of the polymers. The immobilized carbonyl compound-trapping agent is used alone or in a combination  
10 of two or more types of compounds. Also, it is possible to add an appropriate modifier to these polymer materials or, subject them to denaturation treatment such as cross-linking by irradiation or peroxide.

There is no restriction on the shape of carrier. For example,  
15 the carrier can be membrane-like, fiber-like, granular-shaped, hollow fiber-like, non-woven fabric-like, porous, or honeycomb-shaped. The carrier's area of contact with the peritoneal dialysate can be controlled by varying the thickness, surface area, diameter, length, shape, and/or size of the carrier.

20 The carbonyl compound-trapping agent can be immobilized on the above-mentioned carrier by using known methods, such as physical adsorption, specific biochemical binding reaction, ion binding, covalent bonding, grafting, etc. If necessary, a spacer can be inserted between the carrier and the carbonyl compound-trapping  
5 agent. When the carbonyl compound-trapping agent is toxic, the amount released becomes a vital issue. Thus, it is preferred that the carbonyl compound-trapping agent is immobilized on the carrier by a covalent bond so as to minimize the amount released. Functional groups on the carrier are utilized for covalently bonding the  
30 carbonyl compound-trapping agent thereto. The functional group used is, for example, hydroxyl group, amino group, aldehyde group, carboxyl group, thiol group, silanol group, amide group, epoxy group, succinylimino group, etc.; however, the functional group is not limited to these groups. As examples of covalent bonds, ester  
35 bond, ether bond, amino bond, amid bond, sulfide bond, imino bond, disulfide bond, or the like can be given.

A commercially available product, for example polystyrene

carrier having sulfonylhydrazine groups (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES CO.), can be used as a carrier for immobilizing carbonyl compound-trapping agent.

The carrier with the immobilized carbonyl compound-trapping agent of the present invention can be sterilized by an appropriate sterilization method selected from known sterilization methods depending upon the types of carbonyl compound-trapping agent and carrier used. The sterilization method includes, for example, autoclaving, gamma-ray irradiation, gas sterilization, etc.

Carbonyl compound-trapping agent-immobilized carriers could be contacted with blood in various ways. Examples are: the method where collected patient blood is infused into a blood bag filled with carbonyl compound-trapping agent-immobilized carriers, and trapping the carbonyl compounds in patient blood; the method where blood is circulated in a column filled with bead carriers or fiber carriers, or the like, on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized, etc. Not only whole blood, but also separated blood plasma may be used for the treatment. The treated blood may be returned to the patient or, if required, may be stored in a blood bag, or the like. It is also possible to trap carbonyl compounds that generate and accumulate in blood in blood bags during storage, by including carriers on which carbonyl compound-trapping agents are immobilized within the blood bags.

The contact between blood and carriers on which a carbonyl compound-trapping agent of this invention has been immobilized can be carried out during the blood purification step, including hemodialysis, blood filtration, blood filtration dialysis, blood adsorption, and blood plasma separation.

For example, both hemodialysis and trapping of carbonyl compounds can be carried out simultaneously in hemodialysis patients, by placing carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized in the hemodialysis circuit. In this case, it is preferable to use the hemodialysis membrane as the carrier on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized. Known types of dialysis membranes can be used as carriers. Examples are, cellulose derivatives such as regenerated cellulose, and cellulose triacetate; and polymethyl methacrylate,



polyolefin, polysulfone, polyacrylonitrile (PAN), polyamide, polyimide, polyether nylon, silicon, and polyester copolymers, but are not limited thereto. As shown in the Examples, when polysulfone is used as the dialysis membrane, there was a decrease in the carbonyl intermediate product (pentosidine) level. Thus, among the above-mentioned dialysis membranes, it is particularly preferable to use a polysulfone membrane as the carrier. Instead of using a dialysis membrane as a carrier, a column filled with carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized may indeed be placed in the hemodialysis circuit as described above. Through contacting a patient's blood with carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized, carbonyl compounds are trapped from the blood, their damaging activity towards the living body is eliminated, and they become nontoxic. An anticoagulant may be used together to prevent blood-clotting in an extracorporeal circulation. Such anticoagulants include, for example, heparin, low-molecular-weight heparin, and Futhan (Nafamostat mesilate). These may be immobilized on carriers.

It is predicted that there maybe some cases where carbonyl compounds in patient blood are not completely treated during dialysis if the quantity of trapping agent used during the contact with blood is too small. Since pre-determination of the quantity of carbonyl compounds in the patient blood is particularly difficult, it is effective to maintain the activity of as many trapping agents as possible within a range that ensures the safety of the patient. The dose of a trapping agent can be adjusted by altering the quantity of trapping agent immobilized on the carriers, or the dose of carriers on which the trapping agent has been immobilized.

In addition to the organic compounds represented by the above Maillard reaction inhibitors, polymer compounds such as ion exchange resin, or inorganic compounds such as activated carbon, silica gel, alumina, and calcium carbonate can also be used as carbonyl compound-trapping agents of the present invention. These compounds, which are known as filling agents used for chromatography, can trap carbonyl compounds due to their adsorption capability. Such compounds themselves can function as carriers, and therefore, for example, a filtrator installed within an extracorporeal blood

circulation circuit can be filled with them for use. Such a compound can also be utilized as a "carbonyl compound-trapping agent" comprised in the an agent for improving carbonyl stress state of the present invention. In this case, such compounds themselves function as carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized as described above. Alternatively, another carbonyl compound-trapping agent can be further immobilized on carriers themselves having the capability of trapping carbonyl compounds.

An adsorbing-type blood-purification device is known, in which activated carbon is used. This adsorbing-type blood-purification device is used for a supplementary method associated with hemodialysis for the purpose of blood purification in drug poisoning and hepatic coma, and the removal of various intrinsic and extrinsic toxins and vasoactive substances increased in the earlier phases of onset of acute renal failure associated with multi-organ failure. However, it has been completely unknown that such an adsorbing-type blood-purification device is effective as a carbonyl compound-trapping agent.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the effect of changing the type of hemodialysis membrane on blood plasma pentosidine levels (pmol/mg protein) in 3 patients. Each result is shown in a % value relative to the corresponding initial value (41.8 pmol/mg protein for patient 1 ( $\diamond$ ), 22.1 pmol/mg protein for patient 2 ( $\square$ ) or 28.5 pmol/mg protein patient 3 ( $\triangle$ )). Each value obtained is an average value of two samples collected 2 weeks after the end of each dialysis period (in the -2<sup>nd</sup> and 0<sup>th</sup> week of dialysis by AN69; in the 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> week after the switch to PS; in the 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> weeks after the returning to AN69).

Figure 2 shows the suppression effect on the pentosidine level of blood plasma in dialysis patients by the incubation with beads on which a carbonyl compound-trapping agent had been immobilized.

Figure 3 shows the carbonyl compound-trapping action by activated carbon in a dicarbonyl compound solution.

Figure 4 shows the dicarbonyl compound-trapping action by

activated carbon in a peritoneal dialysate.

Figure 5 shows the activated carbon-mediated suppression effect on pentosidine generation when blood plasma from a dialysis patient was incubated at 37°C.

5 Figure 6 shows the removal of carbonyl compounds in blood plasma of a renal failure patient by activated carbon, or sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads. In this diagram, the ordinate shows the carbonyl compound concentration.

10 Figure 7 shows the removal of carbonyl compounds in blood plasma of a renal failure patient by aminoguanidine. In this diagram, the ordinate shows the carbonyl compound concentration.

Figure 8 shows a method for preparing diaminoguanidine-linked polyamide.

15 Figure 9 shows the removal of carbonyl compounds in a dicarbonyl compound solution by diaminoguanidine-linked polyamide.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

20 The present invention is specifically illustrated below with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] The influence of the type of hemodialysis membrane on blood plasma pentosidine level

##### 1. Patients

25 Belgian patients (n=29) and Japanese patients (n=97), 126 patients (69 males and 57 females) in total, who had been subjected to hemodialysis 3 times a week, were tested. They were  $61.2 \pm 13$  (standard deviation) years old on average. Only two of them were affected with mild type-II diabetes mellitus. Each patient used  
30 the same type of hemodialysis membrane for at least 3 months (or, 2 or 3 patients used the same type of membrane for less than 3 months, but ever since initiating hemodialysis). In 26 of 29 Belgian patients, dialysis membranes were reused, but there was no reuse in Japanese patients. Data of residual diuresis (ml/day), surface  
35 area of dialysis membrane, and duration of hemodialysis were obtained from clinical records of each patient.

##### 2. Types of membranes

The following hemodialysis membranes were used: high-flux (UF index > 10 ml/mmHg/h) AN69 (Hospal; France) (group of AN69); high-flux polysulfone (Fresenius; Germany) (group of PS); high-flux polysulfone (Asahi Medical; Japan) (group of APS); high-flux polymethylmethacrylate (Toray; Japan) (group of PMMA); and low-flux cellulosic (Asahi Medical; Japan) (group of cellulose).

### 3. Blood plasma samples

Blood plasma samples were collected from all the 126 patients prior to the first hemodialysis, and then from 66 patients weekly after dialysis.

All the samples were immediately subjected to centrifugal separation. The blood plasma samples frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  were tested as follows:

### 4. Quantification of total pentosidine and free pentosidine

For quantification of total pentosidine, a sample (50  $\mu\text{l}$ ) was lyophilized, dissolved in 100  $\mu\text{l}$  of 6N HCl, encapsulated with nitrogen gas and then incubated at  $110^{\circ}\text{C}$  for 16 hours, neutralized with 100  $\mu\text{l}$  of 5N NaOH and 200  $\mu\text{l}$  of 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4), subsequently filtered through a filter with a pore size of 0.5  $\mu\text{m}$ , and diluted 20 times with PBS. For quantification of the free pentosidine, the sample (50  $\mu\text{l}$ ) was mixed with an equal amount of 10% TCA, and then centrifuged at  $5000 \times g$  for 10 minutes. The supernatant was filtered through a filter with a pore size of 0.5  $\mu\text{m}$  and diluted 4 times with distilled water.

Pentosidine in each of these samples was analyzed by reverse phase HPLC using a C18 reverse phase column (Waters, Tokyo, Japan) (Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, 1996). The effluent was monitored with a fluorescence detector (RF-10A; Shimadzu) at an excitation/detection wavelength = 335/385nm. A standard curve was prepared by using synthetic pentosidine.

The level of protein-bound pentosidine (pentosidine/protein) (pmol/mg protein) was calculated by [total pentosidine in blood plasma (pmol/ml) - free pentosidine (pmol/ml)]/[blood plasma protein concentration (mg/ml)].

### 5. Statistical analysis between groups of patients

The respective values, including quantification of the pentosidine level, are indicated as mean  $\pm$  standard deviation or

percentage (%). The data of residual diuresis was log-transformed. Through one-way analysis of variance (one-way ANOVA) (with F-test), individual data and the pentosidine level were compared between groups of hemodialysis patients using different dialysis membranes.

5 Furthermore, the groups of dialysis membranes were compared and analyzed by using Bonferroni t-test. Through chi 2 test, the degree of residual diuresis was compared between the various groups.

The result of cross-sectional analysis among the five groups of patients is shown in Table 1. There were no significant  
10 age-related differences among the groups. The blood plasma protein level was higher in the AN69 and cellulosic groups. In APS group, the area of the dialysis membrane was larger, and both the period of hemodialysis prior to the study and duration of a single dialysis were longer. On the other hand, residual diuresis was higher in  
15 the PS group.

Table 1

The result of dialysis of five groups of patients with different dialysis membranes						
	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	cellulosic n=29	ANOVA P value
age(year)	58±12	61±13	64±7	61±13	64±16	NS
period of hemodialysis(year)	13.7±7.5 $\alpha$	5.4±6.8	7.8±6.7	9.2±6.5	5.5±4.4	<.001
blood plasma protein level(g/dl)	6.7±0.5**	6.3±0.7	6.8±0.6	6.2±0.3*	7.0±0.4***	<.001
blood plasma albumin level(g/dl)	3.9±0.3 $\diamond\diamond$	3.6±0.4 $\diamond$	3.9±0.4 $\Delta$	3.6±0.3	4.2±0.3***	<.001
duration of hemodialysis(hour)	4.5±0.23 $\beta$	3.98±0.40	4.13±0.23	4.04±0.48	4.00±0.00	<.001
surface area of hemodialysis membrane(m <sup>2</sup> )	1.8	1.28±0.36	1.42±0.34	1.31±0.32	1.32±0.24	ND $\neq$
residual diuresis(ml/day)						
geometric mean(SD)	47(10)	213(250)•	34(13)	47(8)	26(8)	<.001
(range)	(0-800)	(0-3050)	(0-500)	(0-400)	(0-400)	
residual diuresis(%)S	33%	50%•	20%	28%	17%	chi2 P value <0.001

\*\*\* = p&lt;0.001 vs PS and PMMA group

\*\* = p&lt;0.001 vs PMMA group

\* = p&lt;0.05 vs AN69 group

 $\diamond$  = p<0.05 vs APS group $\diamond\diamond$  = p<0.01 vs PMMA and cellulose group $\Delta$  = p<0.05 vs cellulose group $\alpha$  = p<0.01 vs cellulose group $\beta$  = p<0.001 vs all other groups

= p=0.05 vs cellulose group

$\neq$  : The surface of the hemodialysis membrane cannot be considered as a random variable as it is fixed by the physician. It cannot therefore be compared by a statistical test.

S : Percentage of anuria patients

Before dialysis, the levels of protein-bound pentosidine and of free pentosidine in blood plasma were similar among the AN69, PMMA, and cellulosic groups, but were significantly lower in the PS and APS groups. There was no significant difference between the

5 PS and APS groups (Table 2).

Table 2

Pre-dialysis Pentosidine levels in the 5 membrane groups					
	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	cellulosic n=29
pentosidine/protein(pmol/mg protein)	16.2±4.8	15±6.1	25.4±8.4**	23.2±9.3**	21.7±6.3**
free pentosidine(pmol/ml)	32.4±11.3	41.4±22.9	76.4±28.5**	68.8±26.7**	53.7±18.2**
					ANOVA P value <.001 <.001

\*\* = p<0.01 vs PS and APS groups



Univariate analysis of a variety of factors that may influence predialysis blood plasma pentosidine, indicated that residual diuresis significantly affected protein-bound and free pentosidine: the higher the residual diuresis, the lower the pentosidine level. No correlation was found between pentosidine level and blood plasma protein level, albumin level, age, or dialysis history (Table 3). Relating to polysulfone (PS and APS groups) groups, the predialysis pentosidine level in Belgian patients or Japanese patients subjected to dialysis with polysulfone membranes from Fresenius or Asahi Medical co. were similar to each other (Table 4).

Table 3

Univariate analysis of the relationship between pentosidine level and potentially explanatory continuous variables: r values					
	log diuresis	Total protein	Albumin	Age	Duration
pentosidine/protein	-0.28	-0.08	0	0.14	0.03
free pentosidine	-0.36	0.01	-0.12	0.15	0.02

\*\* =  $p < 0.01$

\*\*\* =  $p < 0.001$

Table 4

Pentosidine levels and residual diuresis in polysulfone groups, according to polysulfone brand and/or country of patients

	Fresenius Belgium	Fresenius Japan	Asahi Japan	P value
pentosidine/protein (pmol/mg protein)	$14.6 \pm 6.2$	$15.3 \pm 6.3$	$16.2 \pm 4.8$	NS
free pentosidine (pmol/ml)	$37.3 \pm 19.6$	$45.4 \pm 25.9$	$32.4 \pm 11.3$	NS
residual diuresis (ml/day)	938(23)	49(14)	47(10)	0.004

As described above, it was revealed that pentosidine levels were lower in dialysis patients using polysulfone dialysis membranes than those in dialysis patients using other dialysis membranes. Decreases in pentosidine levels were seen in patients dialyzed with a polysulfone membrane, independent of the patients' country or the manufacturer of the dialysis membranes. Furthermore, although patients subjected to dialysis with polysulfone dialysis

membrane from Ashahi Medical were substantially anuric, pentosidine levels were similarly lower. In the group using polysulfone from Fresenius, there was no alteration in statistical significance in the difference of pentosidine level, even when patients with urinary  
5 volumes greater than 300 ml/min were excluded.

Because AN69 is also high-flux type and pentosidine levels before dialysis in dialysis with high-flux AN69 and low-flux cellulosic showed similar results, the difference in pentosidine level is estimated to be independent of the removing capacity of  
10 dialysis membrane.

The relationship between protein-corrected pentosidine level or free pentosidine level and residual diuresis was analyzed by linear regression analysis. The effect of each explanatory variable on dependent variable (protein-corrected pentosidine  
15 level and free pentosidine level) was tested by variable selection — multiple regression analysis (Forward stepwise multiple regression analysis). All the analyses were carried out by using BMDP statistics software (BMDP is the trade mark of New System Professional Edition: Statistical Solutions Inc., University of  
20 California Press, Berkeley, 1995). A P value less than 0.05 was considered significant.

The analysis result showed that dialysis membrane type and residual diuresis were the two sole independent determinants of protein-bound and free pentosidine levels (Table 5). Considering  
25 the fact that none of the interactions were significant, the influence of residual diuresis on pentosidine level was not affected by dialysis membrane type.

Table 5

The variable selection-multiple regression analysis of determinants of pentosidine levels  
(Forward stepwise multiple regression analysis)

	pentosidine/protein		free pentosidine	
	Increase in R	P value	Increase in R	P value
membrane type	0.53	<0.001	0.59	<0.001
log. diuresis	-0.21	<0.001	-0.36	<0.001
total protein	-0.17	NS	0.05	NS
albumin	-0.05	NS	-0.1	NS
age	0.12	NS	0.16	NS
period of hemodialysis	-0.01	NS	-0.08	NS

6. The effect of dialysis membrane on pentosidine levels before and after hemodialysis

To further analyse the mechanism underlying dialysis membrane effect on predialysis pentosidine levels, pentosidine levels before and after dialysis were determined for four groups of patients with high-flux polysulfone (Fresenius), AN69, PMMA, or low-flux cellulosic dialysis membranes (Table 6).

Table 6

Influence of a single hemodialysis session on pentosidine level				
	PS n=14	AN69 n=15	PMMA n=9	cellulosic n=28
pentosidine/protein (pmol/mg protein)				
Pre	14.6±6.2	25.4±8.4	24.3±8.5	21.8±6.4
Post	13.8±6.6	23.4±5.6	22.8±8.3	22.1±5.8
free pentosidine (pmol/ml)				
Pre	37.3±19.6	76.4±28.5	70.3±26	53.5±18.5
Post	10.9±6.6	17.5±4.9	21.7±7	14.7±6.9
(reduction ratio) (%)	(71±11)	(76±7)	(67±9)	(73±6)

As predicted by the above experiment, the level of protein-bound pentosidine was almost unaltered and also was independent of the dialysis membrane type. Although only the level of free pentosidine markedly decreased, the percentage, which was between 76% (AN69) and 67% (PMMA) was similar in all the groups. There was no significant difference among the groups. Thus, it was revealed that the lower predialysis pentosidine levels observed in dialysis patients using polysulfone membranes could not be

accounted for by differences in the dialysis capacity of the membranes.

The present inventors previously showed that hemodialysis itself did not affect the total pentosidine or protein-bound pentosidine levels (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 880-887, 1997). This finding agrees with the fact that 95% of pentosidine bind with albumin that cannot be eliminated through dialysis (Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7: 1198-1206, 1996). This finding is supported by the result obtained in the above Example with the four different types of dialysis membranes. On the contrary, the amount of free pentosidine decreased by hemodialysis, and a similar phenomenon was observed with every dialysis membrane. This result is predictable by the molecular weight of free pentosidine (379 Da). The fact that pentosidine levels before and after hemodialysis were similar for all the dialysis membranes indicates that not only passive transport, but also absorption of pentosidine occurs during dialysis with polysulfone or other dialysis membranes. The level of absorption of radio-labeled free pentosidine with cellulosic membrane or polysulfone membrane *in vitro* is very small, and in reality, there was no difference.

Thus, the decreased predialysis pentosidine level cannot be explained by the fact that the polysulfone membrane enhances removal of pentosidine. There may be another possibility that the dialysis with polysulfone membrane relates to the suppression of pentosidine production.

As pointed out previously, pentosidine level reflects the concentration of carbonyl intermediates derived from carbohydrates. The polysulfone membrane has the specific effect of removing these carbonyl compounds, and thus, it may be having an effect on pentosidine production. Alternatively, there may be also the possibility that the polysulfone membrane reduces oxidative stress assumed to be associated with uraemia (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 54: 1290-1295, 1998; Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 1170-1181, 1997; Loughrey, CM. et al., *Q. J. Med.*, 87: 679-683, 1994; Ueda, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245: 785-790, 1998; Kumano, K. et al., *Adv. Perit. Dial.*, 1992; 8: 127-130; Witko-Sarsat, V. et al., *Kidney Int.*, 49: 1304-1313, 1996). There is also the

possibility that the decrease in oxidative stress suppresses the production of carbonyl compounds, and as a result, the generation of pentosidine is decreased (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 1170-1181, 1997).

5 7. The effect of switching the dialysis membrane on the pentosidine level

To verify the specific pentosidine-lowering effect of polysulfone, a longitudinal analysis was conducted in three anuria patients subjected to long-term (>5 years) AN69 dialysis. The  
10 patients were switched to a polysulfone (Fresenius) dialysis membrane of similar surface area for 10 weeks, and subsequently, the membrane was returned to AN69. Predialysis samples were collected every 2 weeks before the switch to PS (2 samples), during PS dialysis (5 samples), and 14-16 weeks after the return to AN69  
15 (2 samples).

It was found that protein-bound pentosidine level of each patient gradually decreased after switching to PS dialysis, and subsequently, due to the resumption of AN69 dialysis, the level returned to that when using AN69 prior to the switch to PS (Figure  
20 1).

The decrease in pentosidine level observed in the longitudinal study in patients, which was carried out by switching AN69 to PS dialysis, is only one third of the difference (10.4 compared to 3.6 pmol/mg protein) between the PS and AN69 groups observed in the  
25 cross-sectional study. This discrepancy may be due to the fact that the observation after the transfer to PS dialysis lasted only 10 weeks. If polysulfone reduces the rate of pentosidine generation, it will be possible to explain the fact that protein-bound pentosidine decreased so slowly. Under such circumstances, the  
30 decrease in protein-bound pentosidine level may result from only protein metabolism. A similar observation was made after successful kidney transplantations. In such cases, the decrease in protein-bound pentosidine was considerably slower than the decrease in blood plasma  $\beta$ 2-microglobulin, suggesting that the  
35 decrease occurs very slowly, and the decomposition of protein-bound pentosidine is very slow (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 880-887, 1997; Hricik, DE. et al., *Clin. Transplantation*, 10: 568-573, 1996).

[Example 2] The removal of blood carbonyl compounds by carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized

A cross-linked polystyrene resin bound to a sulfonyl hydrazine group (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES) was used as a carbonyl compound-trapping bead to study its effect in removing blood carbonyl compounds. Blood plasma from a dialysis patient and those supplemented with carbonyl compound-trapping beads were incubated at 37°C to test the pentosidine generation-suppressing effect. 100 µl of dimethylsulfoxide was added to the tube containing carbonyl compound-trapping beads to swell the beads, and then filter-sterilized blood plasma from a predialysis dialysis patient was added thereto. The mixture was incubated at 37°C for one week. After incubation, the beads were removed with a centrifugal filter having a pore size of 0.22 µm (Millipore, UFC30GV00). Then, 50 µl of 10% trichloroacetic acid was added to 50 µl of the bead-free solution, and the mixture was centrifuged to precipitate proteins. The resulting protein pellet was washed with 300 µl of 5% trichloroacetic acid and then dried. Subsequently, 100 µl of 6N HCl was added to the pellet and heated at 110°C for 16 hours, and then, pentosidine was quantified by HPLC (Miyata, T. et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, Miyata, T. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358).

The amount of pentosidine generated during incubation at 37°C is shown in Figure 2. It was found that the addition of carbonyl compound-trapping beads suppressed the generation of pentosidine. In addition, the suppression of pentosidine generation depended on the amount of carbonyl compound-trapping beads added.

These results showed that blood carbonyl compounds could be removed by carriers on which the carbonyl compound-trapping agent had been immobilized. Further, it was revealed that polysulfone membrane was a particularly suitable hemodialysis membrane for improving carbonyl stress state.

[Example 3] The removal of carbonyl compounds from a dicarbonyl compound solution by activated carbon

900 µl of a dicarbonyl solution, in which each of glyoxal,

methyglyoxal, and 3-deoxyglucosone had been dissolved (100  $\mu$ M each) in PBS(-), was added to a tube containing 25 mg or 50 mg of activated carbon (Wako Pure Chemical Industries) and the mixture was stirred with a rotator at room temperature for 19 hours. Then, the solution was filtered through a centrifugal filtration tube with a pore size of 0.22  $\mu$ m (Millipore; UFC30GV00) and the concentrations of glyoxal, methyglyoxal, and 3-deoxyglucosone in the filtrate were measured by high-performance liquid chromatography.

When 900  $\mu$ l of the dicarbonyl solution was added to 25 mg of activated carbon, 71% of glyoxal, 96% of methyglyoxal, and 97% of 3-deoxyglucosone were trapped. When 50 mg of activated carbon was used, 85% of glyoxal, 98% of methyglyoxal, and 98% of 3-deoxyglucosone were trapped (Figure 3).

[Example 4] The removal of dicarbonyl compounds from a peritoneal dialysate by activated carbon

Since typically, a peritoneal dialysate contains a high concentration of glucose, glucose-derived carbonyl compounds are produced during sterilization or storage. These carbonyl compounds are transferred into the living body during peritoneal dialysis, which is one factor causing carbonyl stress state. Thus, the effect of the carbonyl compound-trapping agent of the present invention in removing carbonyl compounds from a peritoneal dialysis liquid was evaluated.

900  $\mu$ l of a peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; Dianeal PD-4, 1.5) was added to a tube containing 25 mg or 50 mg of activated carbon and the mixture was stirred with a rotator at room temperature for 19 hours. Then, the solution was filtered through a centrifugal filtration tube with a pore size of 0.22  $\mu$ m (Millipore; UFC30GV00), and the concentrations of glyoxal, methyglyoxal, and 3-deoxyglucosone in the filtrate were measured by high-performance liquid chromatography.

When 900  $\mu$ l of peritoneal dialysate was added to 25 mg of activated carbon, 56% of glyoxal, 71% of methyglyoxal, and 62% of 3-deoxyglucosone was trapped. When 900  $\mu$ l of peritoneal dialysate was added to 50 mg of activated carbon, 64% of glyoxal, 78% of methyglyoxal, and 77% of 3-deoxyglucosone were trapped (Figure 4).

[Example 5] The pentosidine generation-suppressing effect of activated carbon when blood plasma from a dialysis patient was incubated at 37°C

5        250 µl of filter-sterilized blood plasma from a predialysis dialysis patient was added to a tube containing 12 mg of activated carbon suspended in PBS(-), and the mixture was incubated at 37°C for one week. After incubation, 50 µl of 12N HCl was added to 50 µl of supernatant obtained by centrifugation, and the mixture was  
10 heated at 110°C for 16 hours for hydrolysis. Then, pentosidine was quantified by high-performance liquid chromatography (Miyata, T. et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7:1198-1206, Miyata, T. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:2353-2358).

15        The amount of pentosidine generated by the incubation at 37°C is shown in Figure 5. When compared with the control, 51% of pentosidine generation was suppressed by the addition of activated carbon. This suggested that carbonyl compounds that are precursors of pentosidine were adsorbed by activated carbon.

20        [Example 6] The removal of carbonyl compounds from blood plasma by activated carbon

500 µl of blood plasma from a renal failure patient was added to a tube containing 20 mg or 50 mg of activated carbon (Wako Pure Chemical Industries), and then the mixture was stirred with a rotator  
5 at room temperature for 12 hours. After the separation of activated carbon by centrifugation, the concentrations of glyoxal and methylglyoxal in blood plasma were measured by high-performance liquid chromatography.

30        The concentrations of glyoxal and methylglyoxal in blood plasma were measured as follows. First, 300 µl of 0.67M perchloric acid was added to 200 µl of blood plasma, and then, the mixture was stirred and centrifuged to separate the supernatant. 20 µl of 1% o-phenylenediamine and 50 µl of 10 µM 2,3-butanedione (internal standard) were added to 150 µl of the supernatant. The mixture was  
35 stirred and incubated at 25°C for 1 hour. According to the method described by Ohmori et al. (Ohmori, S. et al., J. Chromatogr., 414: 149-155, 1987), quinoxaline derivatives generated via the reaction



between glyoxal or methylglyoxal and o-phenylenediamine were separated for the quantification by HPLC with a reversed-phase column.

The result is shown in Figure 6. When 20 mg of activated carbon was added to blood plasma, 58% of glyoxal and 65% of methylglyoxal were trapped. When 50 mg of activated carbon was added, 75% of glyoxal and 80% of methylglyoxal was trapped.

[Example 7] The removal of carbonyl compounds from blood plasma by sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads (Ps-TsNHNH<sub>2</sub>)

500  $\mu$ l of blood plasma from a renal failure patient was added to a tube containing 10 mg or 20 mg of sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads and then the mixture was stirred with a rotator at room temperature for 12 hours. After the separation of sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads by centrifugation, the concentrations of glyoxal and methylglyoxal in blood plasma were measured by high-performance liquid chromatography according to the same method as in Example 6. The result is shown in Figure 6. When 10 mg of sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads were added to blood plasma, 45% of glyoxal and 39% of methylglyoxal were trapped. When 20 mg of sulfonyl hydrazine-linked polystyrene beads were added, 75% of both glyoxal and methylglyoxal were trapped.

[Example 8] The removal of carbonyl compounds from blood plasma by aminoguanidine

50  $\mu$ l of a solution in which aminoguanidine (50 mM, or 100 mM) was dissolved in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4) was mixed with 450  $\mu$ l of blood plasma from a renal failure patient, and the resulting mixture was left at room temperature for 12 hours. After 12 hours, the concentrations of glyoxal and methylglyoxal in blood plasma were measured by high-performance liquid chromatography according to the same method as in Example 6.

The result is shown in Figure 7. When aminoguanidine concentration in blood plasma was 5 mM, 50% of glyoxal and 46% of methylglyoxal were trapped. When aminoguanidine concentration was 10 mM, 58% of glyoxal and 70% of methylglyoxal were trapped.

[Example 9] The removal of carbonyl compounds by carriers on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized

The action of removing carbonyl compounds by carriers, on which a carbonyl compound-trapping agent has been immobilized, was evaluated by using diaminoguanidine-linked polyamide. Diaminoguanidine-linked polyamide was prepared by reacting polyamide with epichlorohydrin and adding an aqueous solution of diaminoguanidine (pH 12) thereto, followed by incubation at 80°C for about 1 hour (Figure 8). After the reaction was completed, the resulting diaminoguanidine-linked polyamide was washed with water and then dried for use in the subsequent experiments.

1 ml of a dicarbonyl compound solution (glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxyglucosone; 1  $\mu$ M each in PBS (pH 7.4)) was added to a tube containing 30 mg of diaminoguanidine-linked polyamide. The mixture was stirred with a rotator at room temperature (25°C) for 5 hours, and 100  $\mu$ l of those were centrifuged. The residual glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in the supernatant were converted to derivatives thereof, and were determined by high-performance liquid chromatography. The result is shown in Figure 9. 30% of glyoxal, 56% of methylglyoxal, and 11% of 3-deoxyglucosone were trapped. When diaminoguanidine-free polyamide was used as a negative control under the same conditions, the above carbonyl compound-trapping action was not detectable.

The results described above verified that the carbonyl compounds could be removed effectively from the liquid by carriers on which the carbonyl compound-trapping agent has been immobilized.

#### Industrial Applicability

The present invention enables effective removal of blood carbonyl compounds. The agent of the present invention for improving carbonyl stress state can be used readily by immobilizing it on a dialysis membrane for hemodialysis, or alternatively immobilizing it on other carriers and placing it within the blood circuit. Thus, the present invention makes it possible to ease damages caused by carbonyl compounds (i.e. carbonyl stress) from which renal failure patients have long suffered.

## CLAIMS

1. A carbonyl compound-trapping agent that removes a blood carbonyl compound.

5

2. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 1, wherein said agent is used in hemodialysis.

10

3. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 1, wherein said agent is immobilized on a blood-insoluble carrier.

4. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 3, wherein said carrier is a dialysis membrane.

15

5. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 4, wherein said dialysis membrane is a polysulfone membrane.

20

6. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 1, wherein said carbonyl compound-trapping agent is a Maillard reaction inhibitor.

25

7. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 6, wherein said Maillard reaction inhibitor comprises at least one compound selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, SH group-containing compound, and derivatives thereof.

30

8. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 1, wherein said agent comprises a compound that is insoluble in blood.

35

9. The carbonyl compound-trapping agent according to claim 8, wherein said compound that is insoluble in blood comprises at least one compound selected from the group consisting of an ion exchange resin, activated carbon, silica gel, alumina, and calcium carbonate.

10. An agent for improving the carbonyl stress state in a living

body, wherein said agent comprises a carbonyl compound-trapping agent as an active ingredient.

5 11. An agent for improving the carbonyl stress state in blood, wherein said agent comprises a carbonyl compound-trapping agent as an active ingredient.

10 12. The agent for improving the carbonyl stress state according to claim 11, wherein said agent is immobilized within the blood circuit.

13. The agent for improving the carbonyl stress state according to claim 11, wherein the carbonyl compound-trapping agent is a Maillard reaction inhibitor.

15 14. The agent for improving the carbonyl stress state according to claim 13, wherein said Maillard reaction inhibitor comprises at least one compound selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, SH group-containing compound, and derivatives thereof.

20 15. A method for improving carbonyl stress state, wherein said method comprises the step of contacting, within the blood circuit, a patient's blood with a carbonyl compound-trapping agent.

25 16. The method according to claim 15, wherein said method comprises the step of immobilizing said carbonyl compound-trapping agent on a blood-insoluble carrier.

## ABSTRACT

A carbonyl compound-trapping agent is contacted with a patient's blood. Thereby, carbonyl compounds are effectively  
5 removed from the patient's blood, and thus, damages from carbonyl compounds (i.e. carbonyl stress) can be reduced.

Figure.1

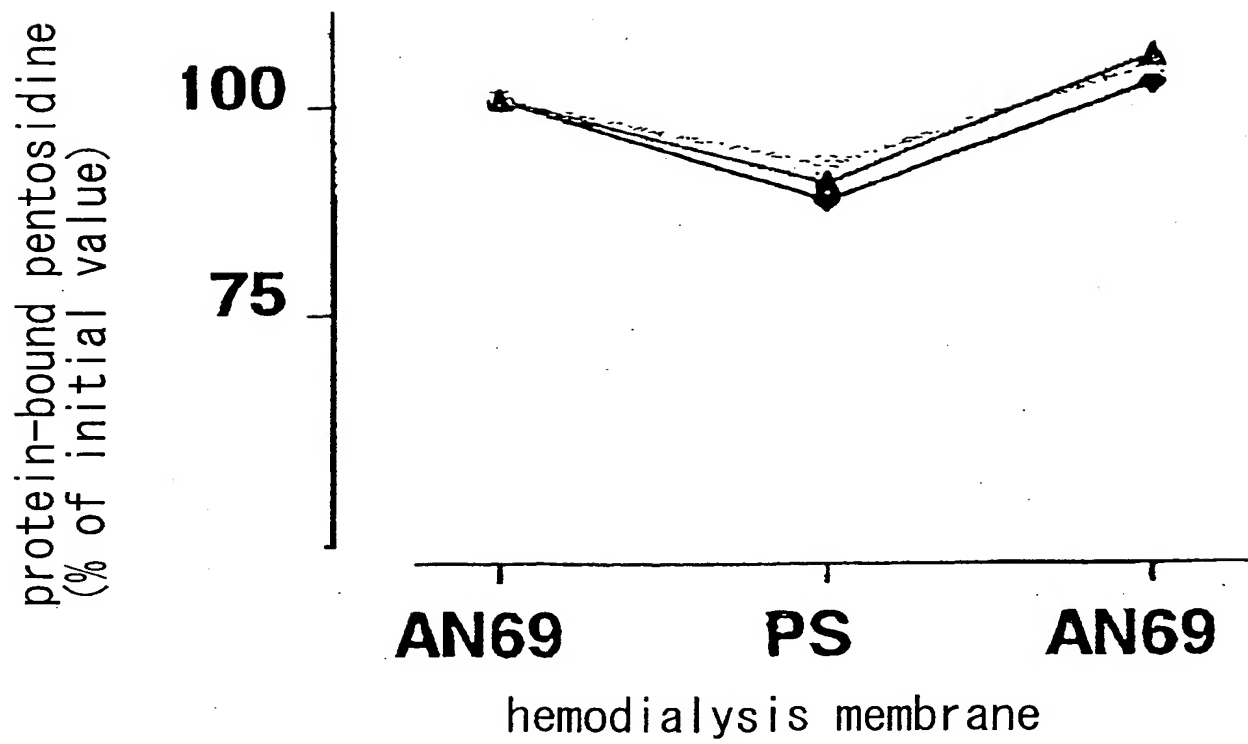


Figure.2

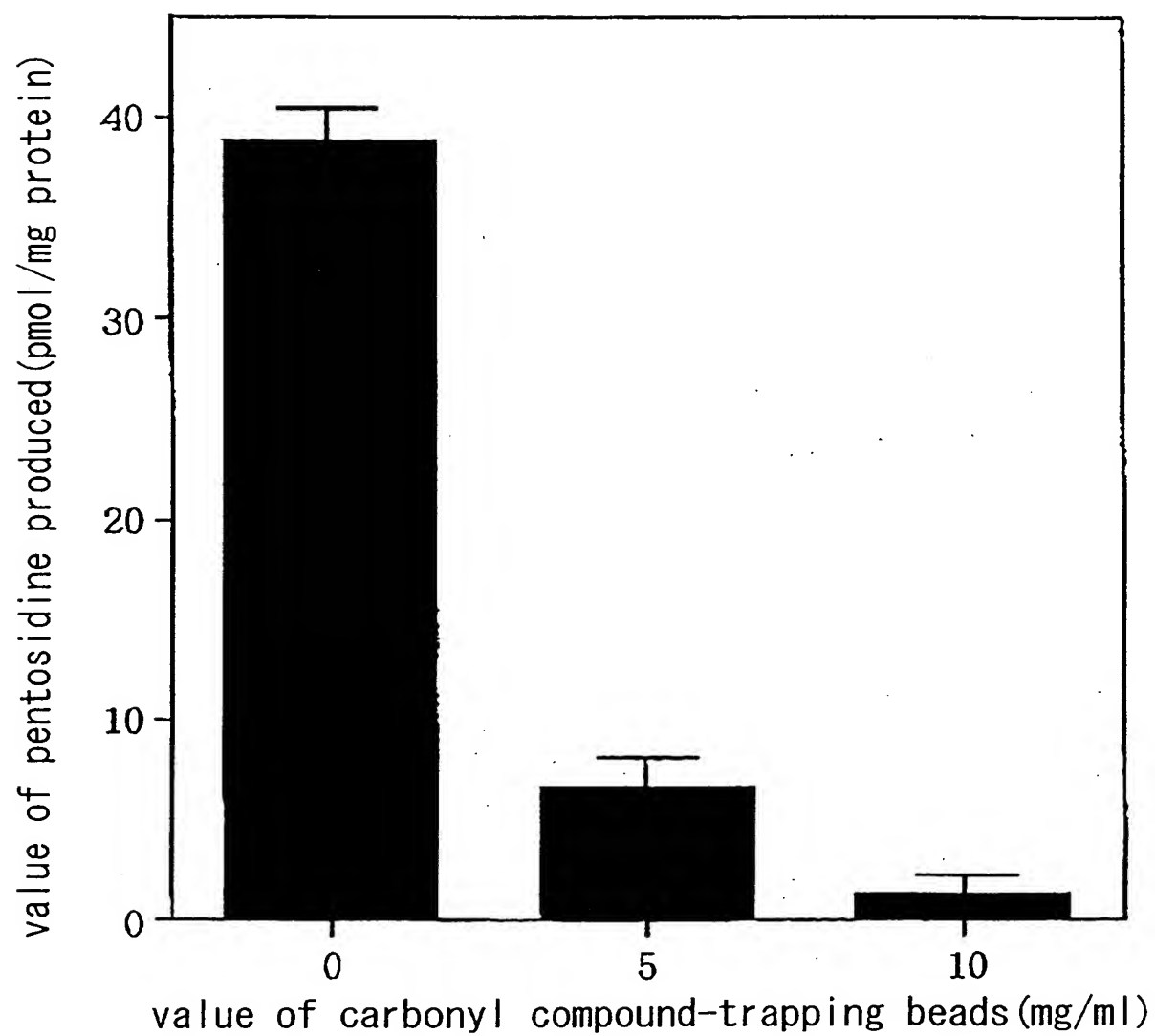


Figure.3

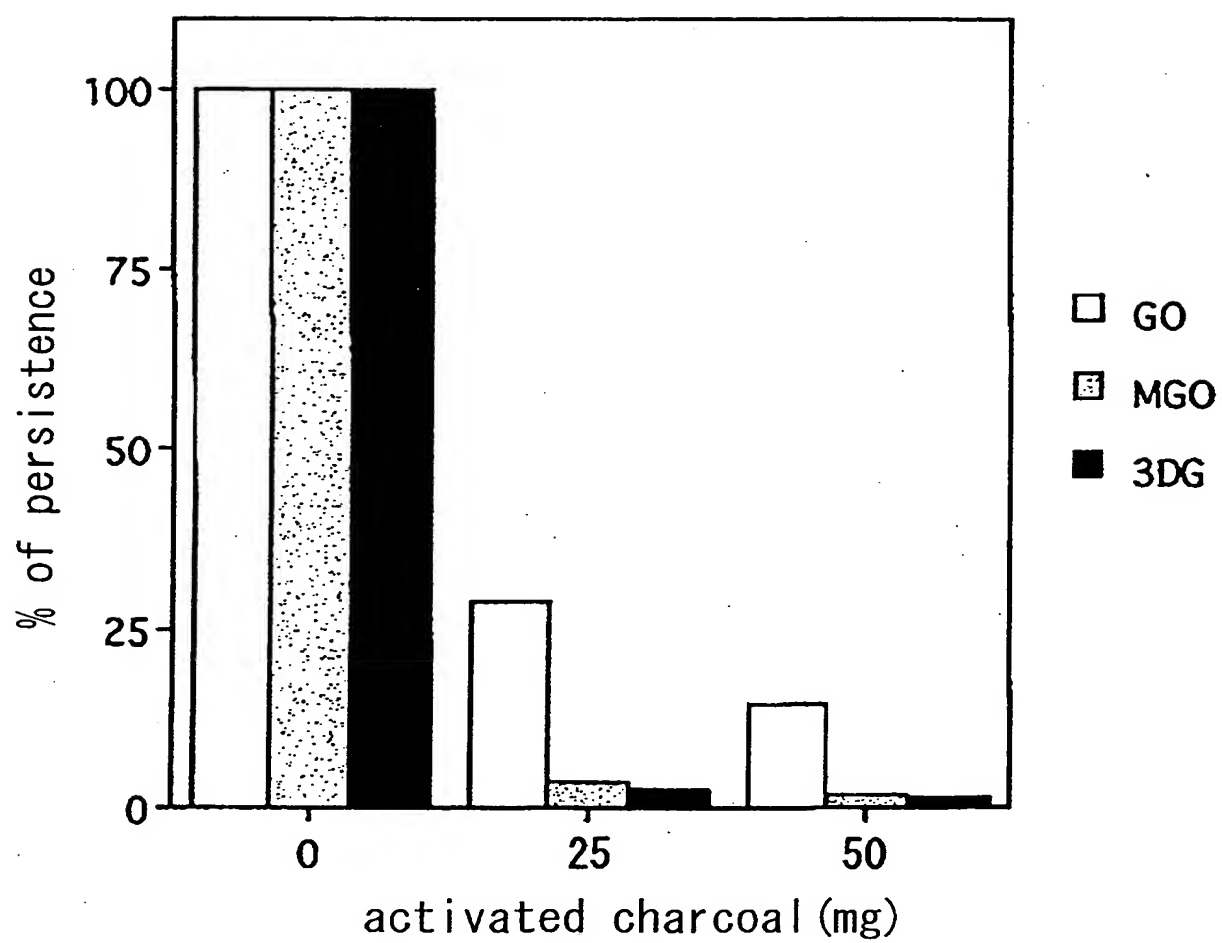




Figure.4

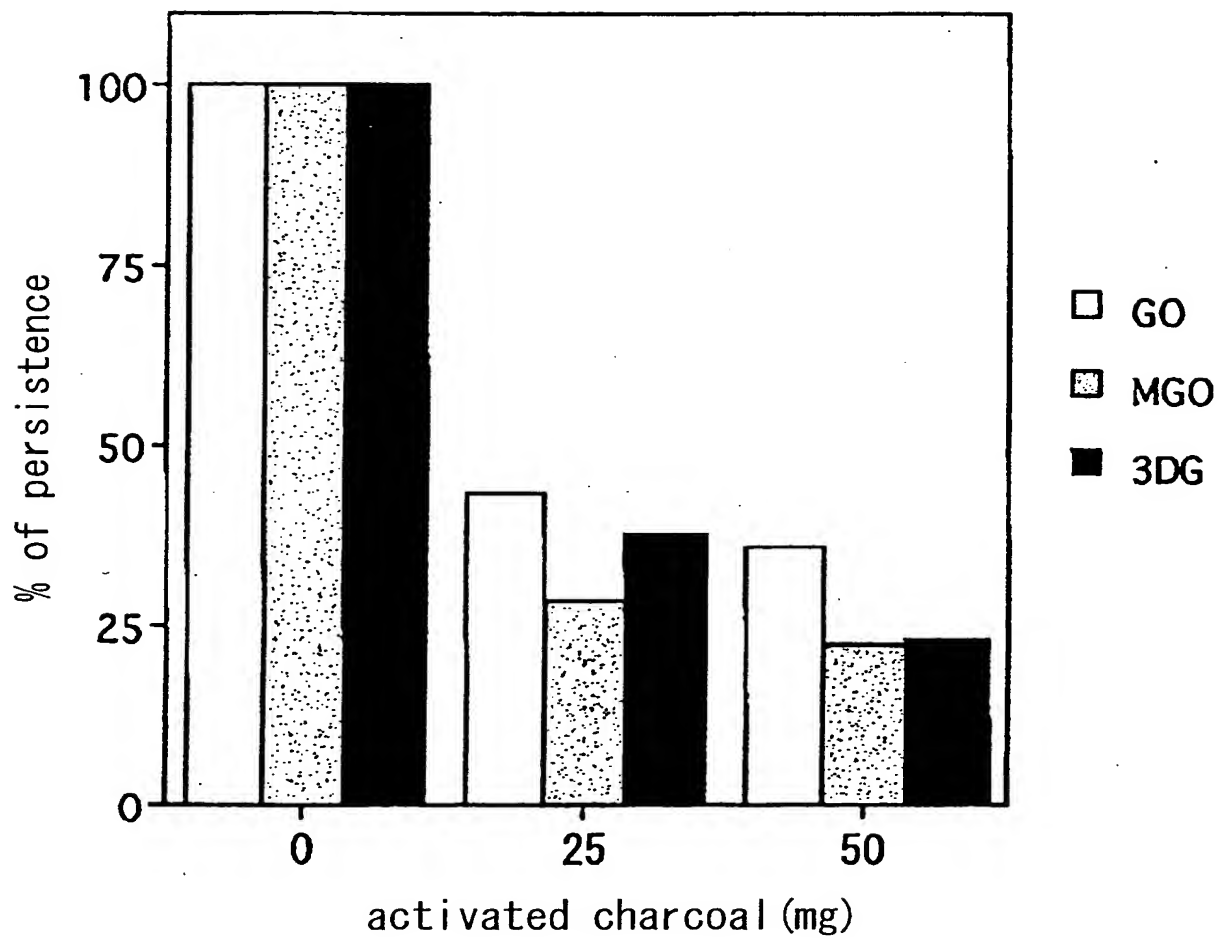


Figure.5

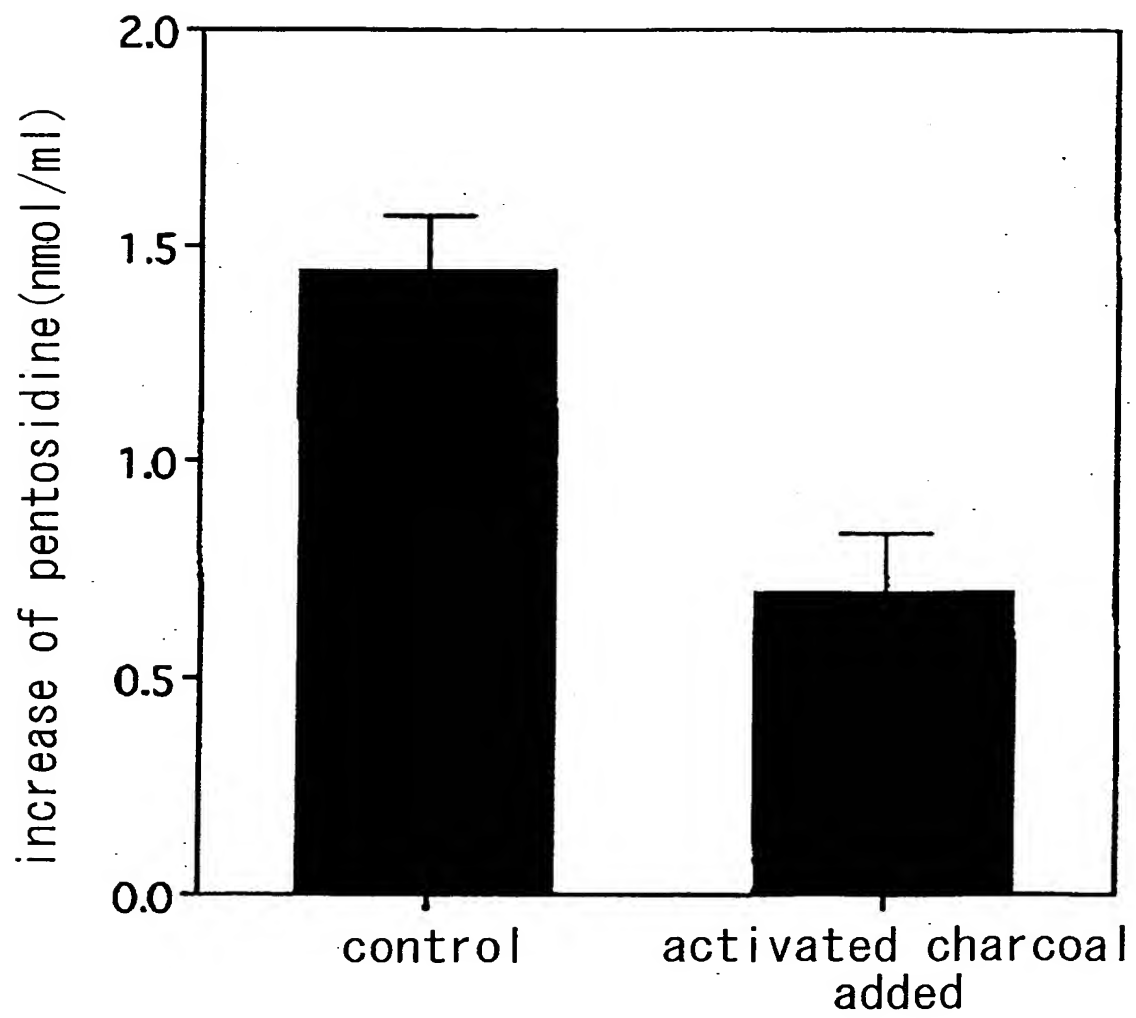


Figure.6

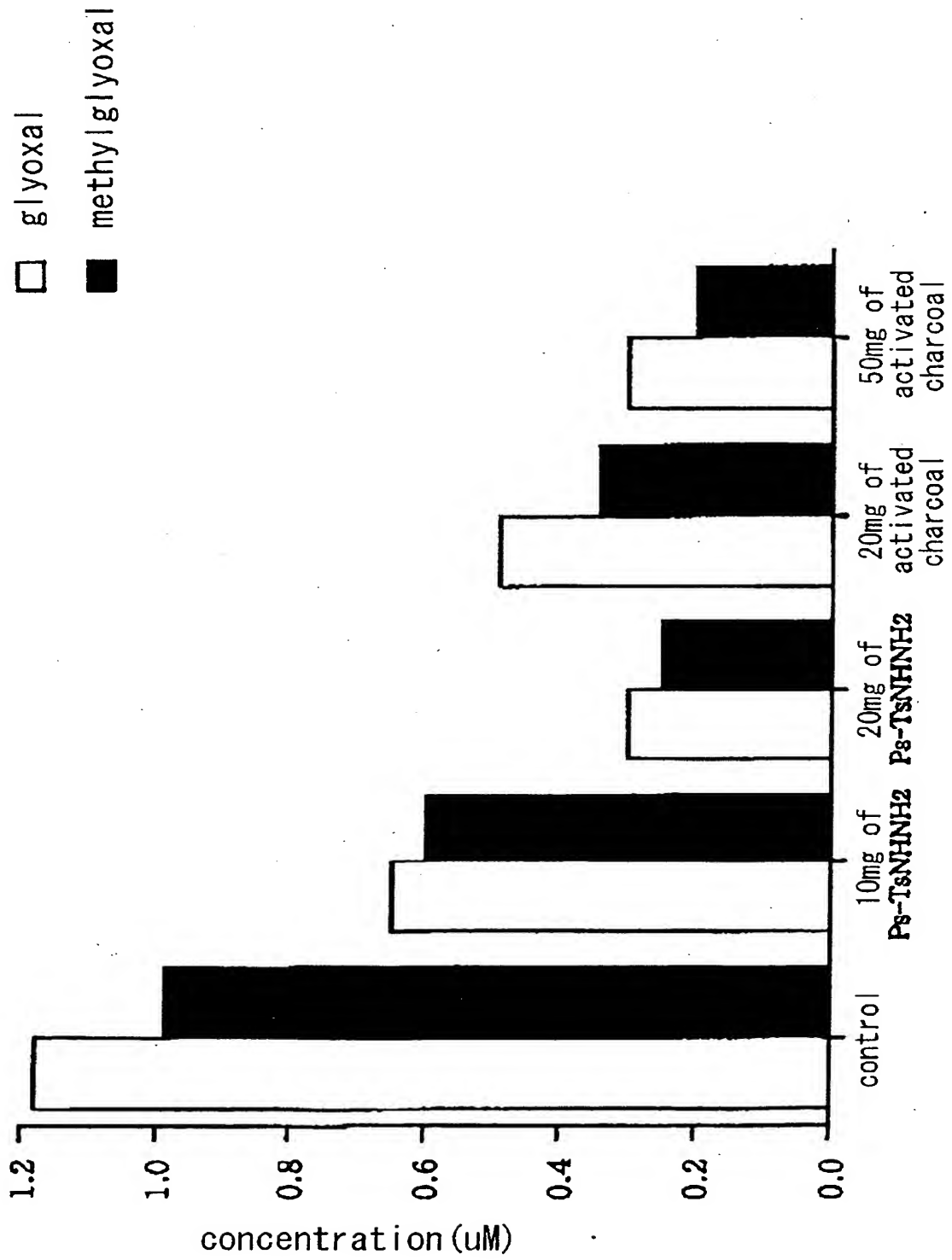


Figure.7

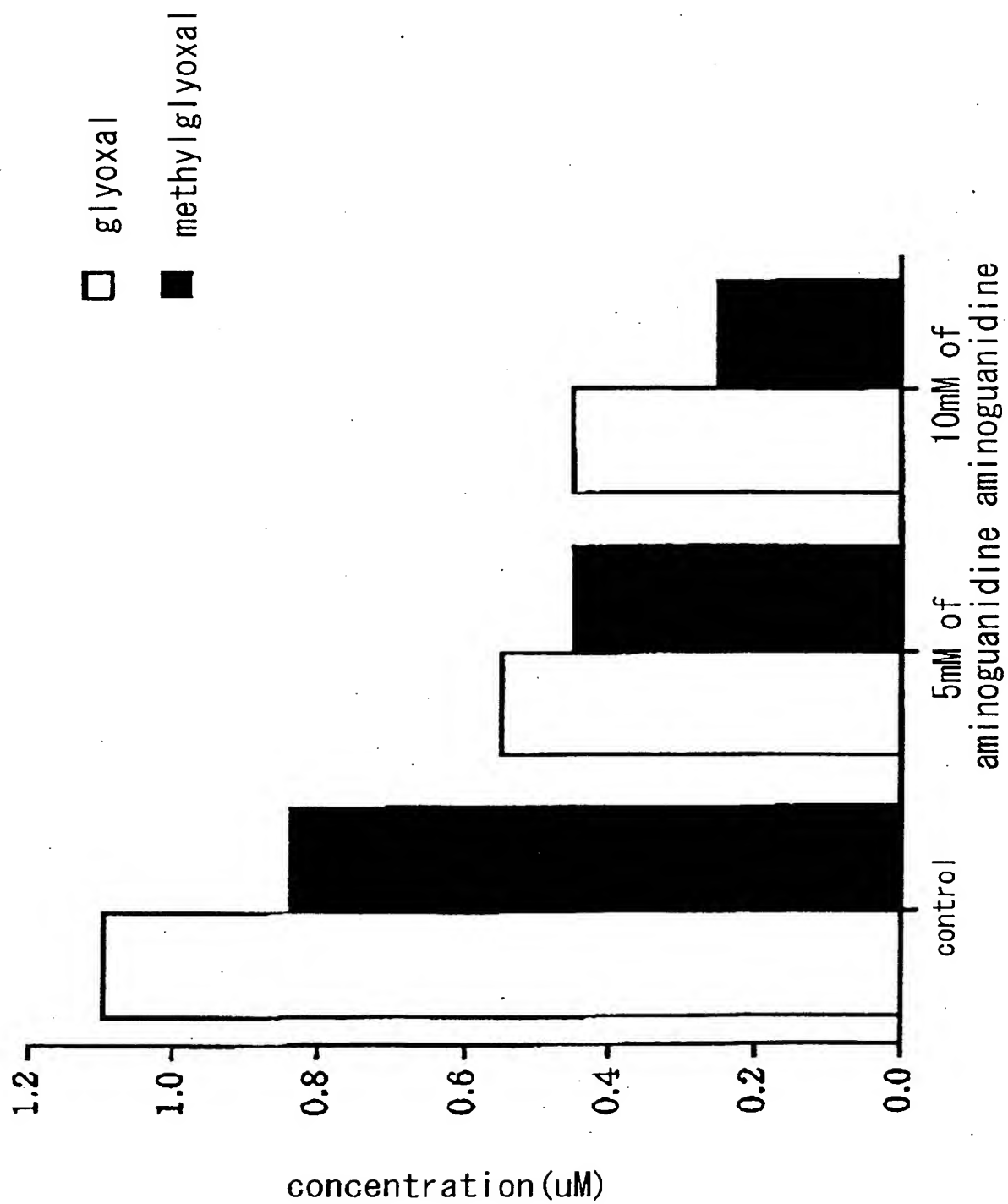


Figure.8

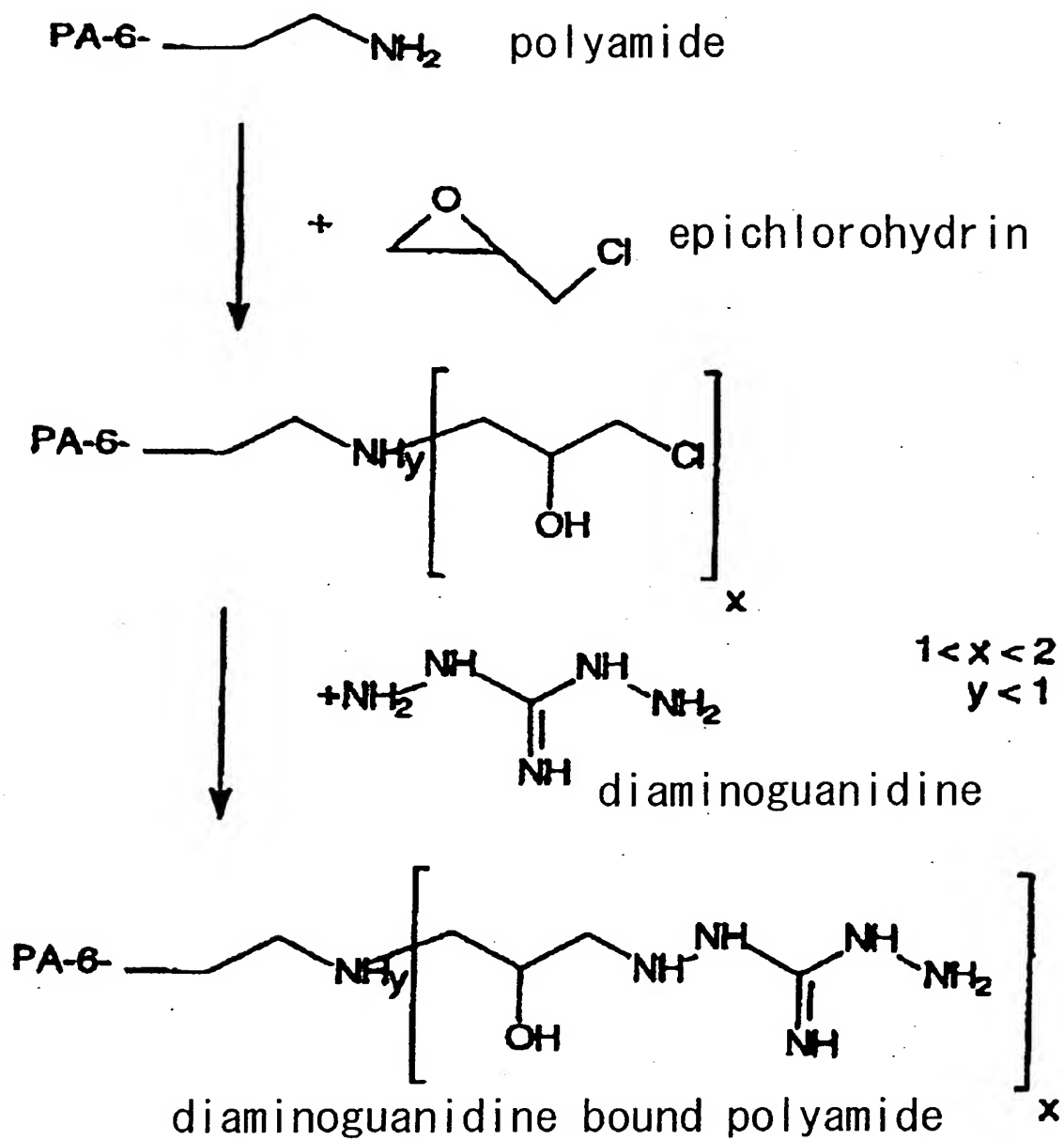


Figure.9

